

**Charakterisierung von PDGF-induziertem
peripheren und dorsalen zirkulären
Membran ‘ruffling’**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von

Kathrin Imke Schloen

aus Göttingen

1. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland
2. Referentin: Professorin Dr. Theresia Stradal
eingereicht am: 27.05.10
mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.07.10

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Tanja Bosse, Julia Ehinger, Aleksandra Czuchra, Stefanie Benesch, Anika Steffen, Xunwei Wu, **Kathrin Schloen**, Hartmut H. Niemann, Giorgio Scita, Theresia E. B. Stradal, Cord Brakebusch, Klemens Rottner. Cdc42 and Phosphoinositide 3-Kinase Drive Rac-Mediated Actin Polymerization Downstream of c-Met in Distinct and Common Pathways. MCB. Oct. 2007, p. 6615-6628 Vol.27, No. 19.

Posterpräsentationen

Kathrin Schloen, Tanja Bosse, Aleksandra Czuchra, Xunwei Wu, Manfred Rohde, Cord Brakebusch, Theresia E.B. Stradal, Klemens Rottner. Differential Functions of Cdc42 in Dorsal *versus* Peripheral Membrane Ruffling Downstream of PDGF (2007). 6th Abercrombie Meeting on Cell Migration: from molecules to organisms. St Catherine's College, Oxford.

Tanja Bosse, Julia Ehinger, Aleksandra Czuchra, Stefanie Benesch, Anika Steffen, Xunwei Wu, **Kathrin Schloen**, Hartmut H. Niemann, Giorgio Scita, Theresia E.B. Stradal, Cord Brakebusch, Klemens Rottner. Cdc42 and PI3K drive Rac-Mediated Actin Polymerization Downstream of c-Met in Distinct and Common Pathways (2007). 6th Abercrombie Meeting on Cell Migration: from molecules to organisms. St Catherine's College, Oxford.

Kathrin Schloen, Tanja Bosse, Aleksandra Czuchra, Xunwei Wu, Manfred Rohde, Cord Brakebusch, Theresia E.B. Stradal, Klemens Rottner. Differential Functions of Cdc42 in Dorsal *versus* Peripheral Membrane Ruffling Downstream of PDGF (2008). The American Society of Cell Biology, 48th Annual Meeting, San Francisco.

Stefan Arens, Markus Ladwein, Christina Borchers, **Kathrin Schloen**, Klemens Rottner, Theresia Stradal. Characterization of Bacterial Virulence Factors that Interfere with Rho-GTPase Signalling (2009). Christmas symposia at the Helmholtz Center for Infection Biology, Braunschweig.

Kathrin Schloen, Tanja Bosse, Manfred Rohde, Cord Brakebusch, Klemens Rottner, Theresia E.B. Stradal. Differential Requirements for the Formation of PDGF-Induced Peripheral *versus* Circular Dorsal Membrane Ruffles (2010). 33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology-Joint Meeting of the German Society for Cell Biology and the “Frontiers in Melanoma Research” Meeting of the German Melanoma Research Network, Regensburg.

Vorträge

An Actin Crown on the Back of the Cell- Molecular Characterization of Dorsal Ruffling (2008). New York Blood Center, New York City.

Differential Requirements for the Formation of PDGF-Induced Peripheral *versus* Circular Dorsal Membrane Ruffles (2010). 33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology-Joint Meeting of the German Society for Cell Biology and the “Frontiers in Melanoma Research” Meeting of the German Melanoma Research Network, Regensburg. Short talk.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aktinpolymerisation	1
1.2	Organisation des Aktinzytoskeletts.....	3
1.2.1	Stressfasern.....	4
1.2.2	Lamellipodien/Membran 'ruffles'	4
1.2.3	Filopodien	5
1.3	Regulation der Aktindynamik.....	6
1.3.1	Aktinbindende Proteine	6
1.3.1.1	ADF/Cofilin.....	6
1.3.1.2	Profilin.....	7
1.3.1.3	Gelsolin.....	7
1.3.1.4	Arp2/3-Komplex	8
1.3.2	WASP/WAVE-Proteinfamilie	10
1.3.3	Ras-Superfamilie.....	15
1.3.3.1	RhoGTPasen	15
1.4	Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Wachstumsfaktoren	20
1.4.1	PDGF und der PDGF-Rezeptor.....	21
1.5	Phospholipide und PI3-Kinasen	22
1.5.1	PI3-Kinase der Klasse IA	23
1.6	Proteinkinase B (PKB oder Akt)	25
1.7	Endozytose	26
1.7.1	Makropinozytose	27
1.8	Mikrotubuli.....	29
1.8.1	Mikrotubuli und das Aktinzytoskelett.....	30
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Materialien	33
2.2	Bakterienstämme	33
2.3	Bakterienkulturmedien und Zusätze	33
2.4	Zellkultur	34
2.4.1	Medien und Lösungen.....	34
2.4.2	Verwendete Zelllinien	35
2.5	Molekularbiologische Methoden	36

2.5.1	Plasmide	36
2.5.2	Oligonukleotide/Primer	37
2.5.3	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	37
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.5.5	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.5.6	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	40
2.5.7	Midi/Maxi-Plasmid-DNA-Präparation	41
2.5.8	Fotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	41
2.6	Proteinbiochemische Methoden	41
2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.6.3	Coomassiefärbung	43
2.6.4	GLISA	44
2.7	Zellbiologische Methoden.....	44
2.7.1	Standardkultur.....	44
2.7.2	Separation und Transfer.....	44
2.7.3	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	45
2.7.4	Bestimmung der Zellzahl.....	45
2.7.5	Aussäen von Zellen in eine Collagen-Matrix.....	46
2.7.6	Makropinozytose-Experiment.....	46
2.7.7	'killing curve'	47
2.7.8	Cre-Rekombinase vermittelte Gendeletion	47
2.7.9	Einzelzellklonierung.....	48
2.7.10	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	48
2.7.11	RNA-Interferenz zur Regulation der Genexpression.....	49
2.7.12	Herstellung von Zellextrakten	51
2.7.13	Verhungern von Zellen	51
2.7.14	Inhibitoren	51
2.7.15	Funktionstest der Inhibitoren	52
2.7.16	Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	53
2.7.17	PDGF-Behandlung der Zellen	53
2.7.18	Separation und Anreicherung von fluoreszenz-markierten Zellen mittels Zellsortierers (FACS).....	54
2.8	Immunchemische Methoden	54
2.8.1	Western Blot	54
2.8.2	Immunfärbung und Chemolumineszenz	56
2.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	56

2.9.1	Epifluoreszenzmikroskopie.....	57
2.9.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	58
2.9.3	Reinigen der Deckgläschen.....	59
2.9.4	Immunfluoreszenzen fixierter Zellen.....	59
2.10	Mikroskopie lebender Zellen mit 'live'-PDGF Stimulation.....	61
2.11	Elektronenmikroskopie	62
3	Ergebnisse	63
3.1	PDGF-induzierte Aktinreorganisation	63
3.2	Die Rolle der PI3-Kinase im PDGF-R Signalweg.....	65
3.2.1	LY294002 inhibiert PDGF-induziertes zirkuläres und verringert peripheres 'ruffling'.....	65
3.2.2	PI3-Kinase-Inhibierung durch LY294002 führt zu reduzierter Rac-Aktivierung.....	68
3.2.3	Wortmannin-Behandlung hemmt die Ausbildung von peripheren 'ruffles' und zirkulären Aktinstrukturen	69
3.2.4	PI3-Kinase-Inhibition durch Wortmannin blockiert die Rac-Aktivierung durch PDGF	71
3.3	Die Rolle der Akt Kinase (PKB) in der Signalweiterleitung von der PI3-Kinase zur Aktinreorganisation.....	72
3.4	Die Rolle der kleinen RhoGTPase Cdc42 in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation.....	76
3.5	N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42	80
3.5.1	Untersuchung von PDGF-induzierter Aktinreorganisation in N-WASP-'knockout' Zelllinien.....	80
3.5.2	N-WASP-'knockdown' hat keinen Einfluss auf zirkuläres 'ruffling'	82
3.5.3	N-WASP lokalisiert nicht in PDGF-induzierten Membran 'ruffles'	84
3.5.4	PDGF-induzierte Makropinosomenbildung ist unabhängig von N-WASP	85
3.6	Rac als Effektor in der Signalkaskade des PDGF-R	87
3.7	Die Rolle des WAVE-Komplexes in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation..	89
3.7.1	Lokalisation von WAVE2, Abi1 und Eps8 in zirkulären Aktinstrukturen.....	90
3.7.2	Nap1-'knockdown' beeinträchtigt PDGF-induziertes 'ruffling'	92
3.8	Die nähere Charakterisierung von 'Abelson interactor 1' (Abi1).....	94
3.8.1	Generierung von Abi1-'knockout' Fibroblasten	94
3.8.2	Etablierung von Abi1-KO-Einzelklonen aus der Mischpopulation	95
3.8.3	Die Lokalisation von Abi1/2 in PDGF-induzierten Aktinstrukturen.....	96
3.8.4	PDGF-induziertes dorsales 'ruffling' ist reduziert in Abi1(-/-)-Zellen.....	98
3.9	Rasterelektronenmikroskopische Analyse zirkulärer 'ruffles'	99
3.10	Lokalisation filopodialer Marker in zirkulären 'ruffles'	101

3.11	Fascin-‘knockdown’ beeinträchtigt PDGF-induziertes dorsales ‘ruffling’	105
3.12	Die Rolle von Mikrotubuli in PDGF-induziertem ‘ruffling’	107
3.12.1	Nocodazol reduziert dorsales und stimuliert peripheres ‘ruffling’	107
3.12.2	Lokalisation von α Tubulin in dorsalen ‘ruffles’	109
3.12.3	WAVE2 lokalisiert in den durch Nocodazol stimulierten peripheren ‘ruffles’ 110	
3.12.4	Rac-Aktivierung durch PDGF nach Nocodazol-Behandlung	112
3.13	Zirkuläres ‘ruffling’ in einer dreidimensionalen Collagen-Matrix	113
4	Diskussion.....	115
4.1	Die Rolle der PI3-Kinase in PDGF-induzierten Signalkaskaden	115
4.2	Akt als Effektor der PI3-Kinase.....	118
4.3	Charakterisierung der kleinen GTPase Cdc42.....	119
4.3.1	N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42	121
4.3.2	WAVE-Komplex-vermittelte Bildung peripherer und zirkulärer ‘ruffles’	121
4.4	Filopodien und ‘microspikes’ als Teil zirkulärer ‘ruffles’	123
4.5	Mikrotubuli in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation	125
4.6	Zirkuläre ‘ruffles’ in der 3. Dimension	126
4.7	Perspektiven und ergänzende Anmerkungen	127
5	Zusammenfassung	129
6	Abkürzungsverzeichnis.....	131
7	Literaturverzeichnis.....	136
8	Anhang	151
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	151
8.2	Tabellenverzeichnis.....	153
9	Danksagung	154
10	Lebenslauf.....	155

1 Einleitung

Das Zytoskelett aller eukaryotischen Zellen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk, das das Mikrofilamentsystem oder Aktinzytoskelett, Mikrotubuli und Intermediärfilamente umfasst und eine wichtige Rolle in vielen diversen zellulären Prozessen wie der Migration, der Endozytose, der Bewegung von Organellen, der Zellteilung oder der Veränderung der Gestalt der Zelle spielt.

Intermediärfilamente wurden das erste Mal 1968 als eine neue Klasse von Filamenten beschrieben, die mit ihrem Durchmesser zwischen der Größe von Aktinfilamenten und Mikrotubuli (Ishikawa et al., 1968) liegen. Es gibt fünf Klassen von Intermediärfilamenten zu denen u.a. die Klasse der Desmine (in Muskelzellen), der Vimentine (mesenchymalen Ursprungs) sowie der Lamine (Kernhülle) gehören (Blain, 2009). Intermediärfilamente dienen der mechanischen Stabilität der Zelle.

Mikrotubuli bestehen aus α - β -Tubulin-Heterodimeren. Diese Untereinheiten ordnen sich *in vivo* linear in 13 sogenannten Protofilamenten zu einem Mikrotubulus zusammen (Wade and Hyman, 1997). An Mikrotubuli findet ein bidirektionaler Transport von Proteinen, Vesikeln und Organellen statt (Berg and Cheney, 2002), und sie spielen eine wichtige Rolle in der Zellmigration (Etienne-Manneville, 2004); zudem bilden Mikrotubuli während der Zellteilung den Spindelapparat aus (Mitchison et al., 1986) (s. 1.8).

Das Aktinzytoskelett setzt sich aus globulären Aktinmonomeren zusammen, welche zu sogenannten Mikrofilamenten polymerisieren und in verschiedenen höher geordneten Strukturen in Erscheinung treten können, wie z.B. Stressfasern, Lamellipodien, Membran 'ruffles', Filopodien sowie sogenannten 'microspikes' (s. 1.2). Diese aktinreichen Strukturen werden u.a. für endo- und exozytotische Prozesse, für die Erhaltung der Zellform und der Polarität, sowie für die Motilität der Zellen und deren Adhesion benötigt (Blain, 2009; Disanza et al., 2005; Dominguez, 2009).

1.1 Aktinpolymerisation

Die Hauptkomponente des Aktinzytoskeletts ist die ATPase Aktin, die ubiquitär exprimiert wird und das Protein ist, das am häufigsten in eukaryotischen Zellen auftritt. Aktinmonomere werden als globuläres Aktin bzw. G-Aktin bezeichnet, welche sich unter physiologischen Bedingungen zu doppelsträngigen helikalen Filamenten, dem

Kommt es zur Bildung eines Nukleationskeims bestehend aus einem Aktindimer bzw. Aktintrimer, schließt sich die Elongationsphase des Filaments an. Am (-)-Ende erfolgt die Depolymerisation von ADP-Aktin (Dominguez, 2009).

Die spontane Formation von Aktinmonomeren zu einem Nukleationskern ist jedoch ineffizient, da thermodynamisch ungünstig; daher und um die subzelluläre Position der Polymerisation regulieren zu können, werden weitere Faktoren benötigt, die zu einer Erzeugung/Stabilisierung der Aktindimere und -trimere führen. Auf diese sogenannten Aktinnukleatoren wird in Kapitel 1.3.1.4 detaillierter eingegangen.

1.2 Organisation des Aktinzytoskeletts

Das Aktinzytoskelett bildet ein komplexes Netzwerk, das bei allen zellulären Vorgängen, die mit Formänderung verbunden sind, sowie bei vielen Signalübertragungsprozessen, eine entscheidende Rolle spielt. Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist essentiell für die Erhaltung der Zellform, der Zellmigration u.a. beim Schließen einer Wunde oder während der Embryogenese, sowie für das Anhaften an und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix durch

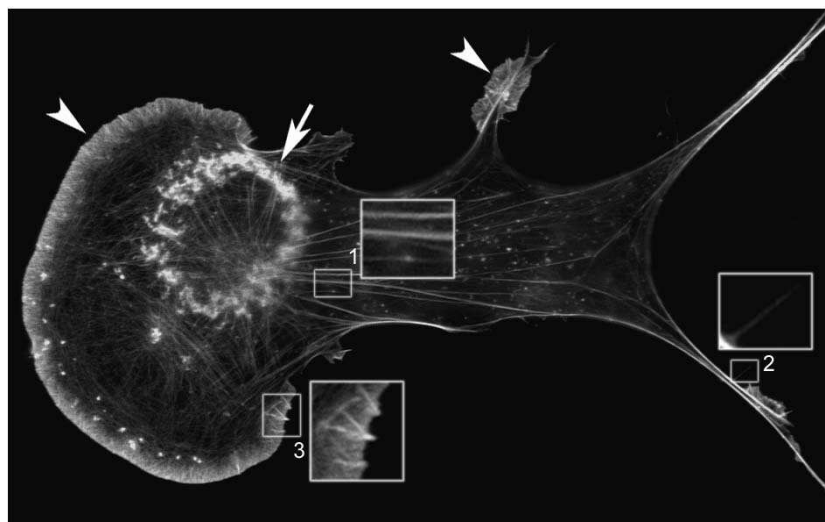


Abbildung 1.2: Strukturen des Aktinzytoskeletts.

Dargestellt ist das Mikrofilamentsystem einer Mausfibroblastenzelle, die nach einer Verhungierung ü./N. mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert wurde. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, das spezifisch F-Aktin bindet. Gezeigt sind (1) Stressfasern, (2) Filopodien und (3) 'microspikes'. Des weiteren weisen die Pfeilspitzen auf das Lamellipodium bzw. 'ruffles' in der Zellperipherie; der Pfeil deutet auf zirkuläres 'ruffling' auf der dorsalen Plasmamembran der Zelle.

Fokaladhäsion (da Costa et al., 2003; Steffen et al., 2004).

Um die Ausübung dieser verschiedensten Funktionen gewährleisten zu können, tritt Aktin in einer Vielzahl von sowohl stabilen als auch hoch dynamischen Strukturen auf, wie z.B. Stressfasern, Lamellipodien, Membran 'ruffles' oder Filopodien.

1.2.1 Stressfasern

Stressfasern (s. Abbildung 1.2 (1)) sind lange, dichte Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten, die mit MyosinII assoziiert sind und die gesamte Zelle durchspannen können. Die aus kontraktile Bündeln von Aktin- und MyosinII-Filamenten bestehenden Stressfasern enden an der Plasmamembran in Fokalkontakten. Dabei handelt es sich um spezialisierte Verankerungspunkte aus transmembranen Adhäsionsproteinen, den sogenannten Integrinen. Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet an die extrazelluläre Matrix (ECM) und vermittelt dadurch die Anheftung; die intrazelluläre Domäne tritt mit speziellen Ankerproteinen wie z.B. Vinculin und Talin in Wechselwirkung, über die die indirekte Verknüpfung mit dem Aktinfilament erfolgt (Alberts et al., 2004).

1.2.2 Lamellipodien/Membran 'ruffles'

Den flachen, breiten Leitsaum an der vorderen Front der sich bewegenden Zelle bezeichnet man als Lamellipodium (s. Abbildung 1.2 Pfeilspitze) (Ingram, 1969). Lamellipodien können abhängig vom Zelltyp eine Breite von ca. 1-5 μm aufweisen und etwa 0.2 μm dick sein. Innerhalb des Lamellipodiums kann es zum Auftreten von zahlreichen strahlenartigen Aktinbündeln kommen, die, wenn sie nicht über den Zellrand hinausreichen, als 'microspikes' bezeichnet werden; erstrecken sie sich über das Lamellipodium hinweg, handelt es sich um Filopodien (Small et al., 2002). 'Microspikes' (s. Abbildung 1.2 (3)) können Vorläufer von Filopodien sein, und es wird angenommen, dass diese Strukturen eine Rolle in der Zellmigration spielen (Mattila and Lappalainen, 2008). Das Lamellipodium besteht aus einem dichten Netzwerk aus diagonal angeordneten Aktinfilamenten, das mit einer Vielzahl an Molekülen und Komplexen assoziiert ist. Das dynamische (+)-Ende aller Aktinfilamente ist zur vorschiebenden Front des Leitsaums hin ausgerichtet (Small et al., 1978).

Lamellipodien können durch die Bildung von fokalen Komplexen mit der extrazellulären Matrix am Substrat adhären, somit erfolgt die Bewegung parallel zum Substrat; kommt es zur Abhebung des Lamellipodiums in Form von gekräuselten

Membranaufwerfungen, spricht man in diesem Fall von peripheren Membran 'ruffles' (Abercrombie and Ambrose, 1958).

Es gibt wenigstens eine weitere Art von 'ruffling'. Dabei handelt es sich um zirkuläre Aktinstrukturen (s. Abbildung 1.2 Pfeil), die nach Stimulierung der Zellen mit Wachstumsfaktoren, wie PDGF-BB oder HGF, auf der dorsalen Plasmamembran der Zelle in Erscheinung treten (Dowrick et al., 1993; Lanzetti et al., 2004; Mellstroom et al., 1983). Außerdem kann die Induktion ähnlicher Strukturen ebenfalls durch Neomycin, einem Inhibitor des Phospho-Inositolzyklus, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), einem Tumor-fördernden Faktor, und durch schwache Laserbestrahlung erfolgen (Gao et al., 2009; Hedberg et al., 1993; Kitano et al., 1986; Schliwa et al., 1984).

Es wurde postuliert, dass dorsale 'ruffles' aus peripheren Aktinstrukturen hervorgehen (Araki et al., 2000). Da periphere 'ruffles' sowohl kontinuierlich als auch als Reaktion auf die Stimulierung mit einem Wachstumsfaktor gebildet werden (Ridley et al., 1992; Suetsugu et al., 2003), zirkuläre dorsale 'ruffles' aber erst mit einer Verzögerung von einigen Minuten nach einer Stimulation transient induziert werden und nach etwa 10-20 min bereits abklingen (Buccione et al., 2004), kann man auf potentielle Unterschiede in den Signalwegen, die zu beiden Aktinstrukturen führen, schließen.

Wichtige Signalmoleküle, die eine Rolle in der PDGF-BB induzierten Kaskade bezüglich zirkulären 'rufflings' spielen sind u.a. die PI3-Kinase, Abi1 und β Pix, die kleinen RhoGTPasen Rac und Cdc42 sowie die RabGTPasen Rab5 und Rab35 (Campa et al., 2006; Hooshmand-Rad et al., 1997; Lanzetti et al., 2004; Shim et al., Wennstrom et al., 1994a; Wymann and Arcaro, 1994; Yang et al., 2006a).

Dorsales 'ruffling' wird u.a. mit dem Prozess der Rezeptorinternalisierung und der Makropinozytose (s. 1.7.1) in Zusammenhang gebracht (Dowrick et al., 1993; Orth and McNiven, 2006). Dennoch muss die Funktion des zirkulären 'rufflings' und die Frage nach einer physiologischen Relevanz noch eingehender untersucht werden.

1.2.3 Filopodien

Filopodien (s. Abbildung 1.2 (2)) sind hoch dynamische, fingerähnliche Strukturen in der Zellmembran mit einem gebündelten Kern aus parallelen Aktinfilamenten (Goley and Welch, 2006), deren Polymerisation, ähnlich wie im Lamellipodium, an den Spitzen der Filamente stattfindet (Mallavarapu and Mitchison, 1999), d.h. das (+)-Ende des Aktinfilaments weist in Vorschubrichtung (Small et al., 2002). Sie dienen der Wahrnehmung ihrer Umgebung und spielen im neuronalen Wachstumskegel wahrscheinlich eine Rolle im Dirigieren von Axonen und Dendriten (Gallo and

Letourneau, 2004). Filopodien können Bestandteil des Lamellipodiums sein bzw. aus 'microspikes' hervorgehen; jedoch handelt es sich bei beiden Strukturen nicht um eine Grundvoraussetzung für die Bildung von Filopodien (Block et al., 2008; Small et al., 2002; Steffen et al., 2006; Vidali et al., 2006).

1.3 Regulation der Aktindynamik

1.3.1 Aktinbindende Proteine

Die dynamische Natur von Aktinfilamenten ist Grundvoraussetzung für eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Die Aktinkonzentration in eukaryotischen Zellen liegt bei 100 μM , die kritische Konzentration am (+)-Ende bei nur etwa 0.1-1 μM , so dass Zellen Mechanismen entwickelt haben um die Anzahl der freien 'barbed'-Enden, also die spontane Polymerisation zu kontrollieren. Die räumliche Organisation und die Polymerisation zu Aktinfilamenten wird durch eine ganze Fülle von aktinbindenden Proteinen reguliert, die in vier Klassen eingeteilt werden können. Dabei handelt es sich um Proteine, die (1) die Depolymerisation der Filamente beeinflussen, (2) die mit monomeren G-Aktin assoziiert vorliegen, (3) die das Ende der Filamente bedecken ('capping'-Proteine) und (4) die Aktin-Nukleation unterstützen (Disanza et al., 2005; Millard et al., 2004).

1.3.1.1 ADF/Cofilin

ADF ('Actin-depolymerizing factor')/Cofilin gehört zur Klasse der Proteine, die die Depolymerisation des Aktinfilaments beeinflussen. Es kommt in allen Eukaryoten vor und wird ubiquitär exprimiert. Cofiline besitzen die Fähigkeit sowohl mit G- als auch mit F-Aktin zu interagieren, vorzugsweise mit der ADP-gebundenen Form (Bamburg, 1999; Saarikangas et al.). Sie fördern eine schnelle Aktindynamik durch Depolymerisation (Carlier et al., 1997) und durch die Fragmentierung von Aktinfilamenten (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Chan et al., 2009; Pavlov et al., 2007), wodurch z.B. auf einen Stimulus hin durch die Schneide-Aktivität von ADF/Cofilin neue kompetente Filament-(+)-Enden bereitgestellt werden (Ghosh et al., 2004). Die Aktivität von ADF/Cofilin wird über den pH-Wert, die Interaktion mit anderen Proteinen sowie die Phosphorylierung reguliert (Eiseler et al., 2009; Van Troys et al., 2000; Van Troys et al., 2008), wobei ADF/Cofilin im unphosphorylierten Zustand aktiv ist (Paavilainen et

al., 2004). Die Regulation erfolgt zudem über das Phosphatidyl-Inositolphosphat PIP_2 (van Rheenen et al., 2007).

1.3.1.2 Profilin

Profilin liegt in Assoziation mit G-Aktin vor. Profileine sind wie Cofiline hoch konserviert und ubiquitär exprimiert. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Aktindynamik in allen eukaryotischen Zellen ein. Das kleine, globuläre Protein bindet wenigstens drei verschiedene Typen von Liganden: monomeres G-Aktin, mit höherer Affinität für ATP-G-Aktin als für ADP-G-Aktin und katalysiert den Nukleotidaustausch an Aktinmonomeren (Pollard et al., 2000), Phosphoinositide, mit einer leicht stärkeren Affinität an PIP_3 als an PIP_2 (Lassing and Lindberg, 1988; Moens and Bagatolli, 2007) sowie an Proteine, die eine prolinreiche Region aufweisen, wie z.B. Mitglieder der Ena/VASP-, der Formin bzw. der WASP/WAVE-Familie (Sohn and Goldschmidt-Clermont, 1994; Suetsugu et al., 1998; Watanabe et al., 1997; Witke, 2004). Profileine fungieren sowohl in Signalwegen, die Arp2/3-Komplex bzw. Formin-abhängige Aktinnukleation induzieren und werden für die geregelte Zellmigration und Zellteilung benötigt (Jockusch et al., 2007; Lambrechts et al., 2006; Pollard, 2007). In der Abwesenheit von freien Aktinfilamenten sequestriert Profilin ATP-Aktin-Monomere. Stehen hingegen freie 'barbed'-Enden zur Verfügung fördert Profilin das Wachstum des Filaments, so dass Profilin je nach zellulärer Situation die Aktinpolymerisation verhindern oder fördern kann (Pantaloni and Carlier, 1993; Pollard et al., 2000; Witke, 2004). Eine Bindung von $\text{PIP}_2/\text{PIP}_3$ an Profilin induziert die Dissoziation des bestehenden Aktin-Profilin-Komplexes (Lassing and Lindberg, 1988; Lu et al., 1996).

1.3.1.3 Gelsolin

Die Gelsolin-Superfamilie umfasst sieben verschiedene Proteine, wobei Gelsolin als erstes Mitglied entdeckt wurde. Es ist u.a. ein Vertreter der 'capping'-Proteine. Es besteht aus sechs strukturell ähnlichen Domänen (G1-G6), die im inaktiven Zustand zu einer kompakten Konformation gefaltet sind und nicht mit Aktin interagieren (Burtnick et al., 1997; Burtnick et al., 2004; Sun et al., 1999; Urosev et al., 2006). Gelsolin zeichnet sich dadurch aus, dass es sowohl die Eigenschaft besitzt wie Cofilin Aktinfilamente zu fragmentieren als auch als 'capping'-Protein am (+)-Ende des Filaments zu fungieren. Das führt dazu, dass ein 'pool' an monomerem Aktin geschaffen wird, da die Depolymerisation an den neu geschaffenen (-)-Enden überwiegt, wenn die

entsprechenden (+)-Enden blockiert (=‘gecappt’) sind (Disanza et al., 2005). Nicht zuletzt kann auf diese Weise die Nettopolymerisation von Aktinfilamenten auf definierte Stellen eingeschränkt werden (Cooper and Schafer, 2000). Gelsolin trägt zu einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie der Zellmotilität und der Morphogenese bei (Kwiatkowski, 1999; Silacci et al., 2004).

Im aktiven Zustand werden die F-Aktinbindenden Bereiche (G2-G3) und die zwei G-Aktin-sequestrierenden/F-Aktin-‘capping’ Domänen (G1 und G4) offengelegt, woraufhin das Schneiden und/oder das ‘capping’ von Aktinfilamenten stattfindet (Burtnick et al., 1997; Burtnick et al., 2004; Sun et al., 1999). Die Regulation von Gelsolin erfolgt durch den pH-Wert, die Ca^{2+} -Ionen-Konzentration und Phosphoinositide (McGough et al., 2003), wobei die Bindung an PIP_2 die Interaktion von Gelsolin mit F-Aktin inhibiert (Janmey and Stossel, 1987; Xian and Janmey, 2002).

1.3.1.4 Arp2/3-Komplex

Die spontane Nukleation von Aktin ist aufgrund der inhärenten Instabilität von Aktindimeren bzw. -trimeren energetisch ungünstig (Frieden and Goddette, 1983; Mullins et al., 1997). In Zellen wird diese kinetische Barriere durch aktinnukleierende Faktoren überwunden. Aktinnukleatoren steuern die gesamte Polymerisation verschiedener Aktinstrukturen und spontane Polymerisation- sowohl Nukleation als auch Elongation- ist *in vivo* unterbunden und durch signalabhängige katalytische Prozesse reguliert (Qualmann and Kessels, 2009). Der erste Aktinnukleator, der in einem Screen für mögliche Bindungspartner von Profilin identifiziert wurde und für den gezeigt werden konnte, dass er die Aktinpolymerisation stimuliert, ist der Arp2/3-Komplex (Machesky et al., 1994; Welch et al., 1997b).

Er setzt sich aus sieben verschiedenen Polypeptiden zusammen und ist evolutionär konserviert von der Hefe bishin zum Menschen (Machesky et al., 1997; Welch et al., 1997). Zwei der Untereinheiten sind Aktin-verwandte Proteine (‘Actin related proteins’), Arp2 und Arp3, die beide etwa eine 45 % -tige Homologie zu Aktin aufweisen (Alberts et al., 2004); bei den weiteren fünf Untereinheiten handelt es sich um als Arpc (‘actin-related protein complex’) 1 bis 5 bezeichnete Proteine (Pollard et al., 2000).

Gibt man zu einer ATP-G-Aktin Lösung den Arp2/3-Komplex, stimuliert dieser die Aktinpolymerisation jedoch nur schwach, da die intrinsische Aktivität des Komplexes eher schwach ist. Arp2 und Arp3, die im aktiven Zustand den Nukleationskeim bilden, werden durch die weiteren fünf Untereinheiten des Komplexes reguliert. Für die Aktivierung des Komplexes muss eine Konformationsänderung erfolgen (Robinson et al., 2001). Diese wird wiederum durch regulatorische Proteine, die sogenannten

Nukleations-fördernden Faktoren (NPF) induziert, die dazu selbst wieder verschiedene zelluläre Signale integrieren. Filamentöses Aktin und die Verfügbarkeit von Monomeren tragen auch zur Stimulation des intrinsisch inaktiven Arp2/3-Komplexes bei (May, 2001; Pollard et al., 2000).

ActA, ein Oberflächenprotein von *Listeria monocytogenes*, war der erste NPF, der entdeckt wurde (Welch et al., 1998); darauffolgend wurden noch eine Reihe weiterer NPFs identifiziert wie z.B. die Mitglieder der WASP/WAVE-Proteinfamilie (Machesky and Insall, 1998; Machesky et al., 1999; Rohatgi et al., 1999; Winter et al., 1999; Yazar et al., 1999). Allen NPFs gemein ist ein konserviertes, meist C-terminales Motiv, welches die Bindung an den Arp2/3-Komplex vermittelt. Dabei handelt es sich um eine saure Domäne, die eine hohe Dichte an Asparagin- und Glutaminsäure zeigt (May, 2001). Sie werden entsprechend ihrer Funktion in zwei Klassen eingeteilt. Zu den NPF-Proteinen der Klasse I zählen u.a. ActA, die Proteine der WASP ('Wiskott-Aldrich syndrome protein')/WAVE ('WASP family verprolin homologous')-Familie, auf die in Punkt 1.3.2 näher eingegangen wird, und eine Reihe von erst kürzlich identifizierten Proteinen wie JMY, WHAMM und WASH (Campellone et al., 2008; Linardopoulou et al., 2007; Takenawa and Suetsugu, 2007). Vertreter der Klasse II der NPF-Proteine sind z.B. Abp1 ('actin-binding protein1') aus Hefe oder Cortactin (Goley and Welch, 2006).

Es wird angenommen, dass der Arp2/3-Komplex, aufgrund der homologen Struktur zu Aktin, ein Aktindimer nachahmt, so dass Aktinmonomere an das Pseudo-(+)-Ende binden können (Goley and Welch, 2006). Es gibt zwei Modelle, die die Arp2/3-Komplex vermittelte Aktinpolymerisation beschreiben und in denen es in beiden Fällen zu Verzweigungen von Aktinfilamenten kommt: bei dem 'barbed'-Ende Verzweigungsmodell lagert sich der Arp2/3-Komplex an das (+)-Ende eines bestehenden Filaments an und dient als Nukleationskeim, an dem Filamentwachstum am Mutter- sowie am neuen Tochterfilament stattfindet (Pantaloni et al., 2000). Das dendritische Nukleationsmodell beschreibt die seitliche Anlagerung des Komplexes an ein bestehendes Mutterfilament, wodurch es zu einer Verzweigung und zur Bildung eines Tochterfilaments kommt (Machesky et al., 1999; Mullins et al., 1998).

Jedoch bestehen einige Kontroversen bezüglich der Stabilität der Arp2/3-Komplex-inuzierten Filamentverzweigungen in Zellen sowie der generellen Existenz von einem verzweigten Aktinnetzwerk in protrusiven Strukturen (Koestler et al., 2008; Lai et al., 2008; Mahaffy and Pollard, 2008; Urban et al.).

Der Arp2/3-Komplex lokalisiert in der Zelle in Bereichen hoher Aktindynamik, wie z.B. in Lamellipodien und Pseudopodien, nicht aber in Filopodien (Disanza et al., 2005; Goley and Welch, 2006; Pantaloni et al., 2001; Svitkina and Borisy, 1999). Es konnte beobachtet werden, dass die Anwesenheit des Arp2/3-Komplexes für tierische Zellen von vitaler Bedeutung ist, da RNAi einzelner Untereinheiten (Harborth et al., 2001), sowie genetische Inaktivierung in Zellen lethal ist (Stradal et al., 2004).

Weitere Aktinnukleatoren neben dem Arp2/3-Komplex sind Mitglieder der Formin-Familie sowie die Proteine Spire, Cordon Bleu, Leiomodin und – neben seiner Funktion als Arp2/3-Aktivator- JMY. Sie alle fördern das Wachstum unverzweigter Aktinfilamente, wobei letztere eine oder mehrere WH2-Domänen aufweisen (Ahuja et al., 2007; Chereau et al., 2008; Kovar, 2006; Quinlan and Kerkhoff, 2008; Zuchero et al., 2009). Die Regulation aller Nukleatoren erfolgt u.a. durch kleine GTPasen, Phosphoinositide und Phosphorylierung (Saarikangas et al.), wie dies z.B. für den Arp2/3-Komplex gezeigt werden konnte, der nur im phosphoryliertem Zustand aktiv ist (LeClaire et al., 2008).

1.3.2 WASP/WAVE-Proteinfamilie

Bei den Mitgliedern der WASP- und WAVE- (auch als SCAR 'Suppressor of cyclic AMP repressor' bezeichnet) Familie handelt es sich um Proteine, die Signale von kleinen RhoGTPasen wie Rac und Cdc42 auf den Aktinnukleator Arp2/3-Komplex übertragen und ihn so aktivieren (Stradal et al., 2004). Sie gelten als die potentesten Aktivatoren dieses Nukleators (Disanza et al., 2005).

Die Familie setzt sich in Säugern aus den Proteinen WASP, N-WASP und den drei WAVE-Isoformen zusammen. Die Untergruppierung in WASPs und WAVEs erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien des insgesamt weniger konservierten N-Terminus und spiegelt auch die divergenten Regulationsmechanismen wider.

WASP war das erste Mitglied der Familie, das als Produkt des Gens identifiziert wurde, das in Patienten mit dem Wiskott-Aldrich Syndrom in mutierter Form vorlag (Derry et al., 1994). Die Krankheit wird X-chromosomal vererbt und hat, da die Expression von WASP auf das hämatopoetische System beschränkt ist, Immundefekte zur Folge (Miki et al., 1996; Snapper and Rosen, 1999; Stradal et al., 2004; Symons et al., 1996).

N-WASP, das zuerst aus Rattenhirn isoliert wurde (Miki et al., 1996), und WAVE1 bzw. WAVE2 werden weitgehend ubiquitär exprimiert (Miki et al., 1998; Stradal et al., 2004; Suetsugu et al., 1999), wobei die Expression von WAVE2 in den meisten Geweben, mit Ausnahme vom Gehirn, stärker ist als die von WAVE1. Die WAVE3-Expression ist

auf bestimmte Bereiche des adulten Gehirns beschränkt (Ladwein and Rottner, 2008; Sossey-Alaoui et al., 2003).

WASP, N-WASP und WAVE-Proteine zeigen eine ähnliche Organisation ihrer Module. Sie enthalten eine konservierte C-terminale Effektordomäne (VCA) und eine N-terminale Domäne, die sich innerhalb der Familienmitglieder unterscheidet. Die VCA-Domäne vermittelt die Bindung an den Arp2/3-Komplex und Aktin; sie allein reicht aus, um den Arp2/3-Komplex zu aktivieren und infolgedessen die Aktinpolymerisation zu stimulieren. Der N-Terminus ist für die Regulation der C-terminalen Domäne z.B. über Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich (Carlier et al., 2003; Disanza et al., 2005; Pollard and Borisy, 2003; Stradal et al., 2004; Takenawa and Miki, 2001).

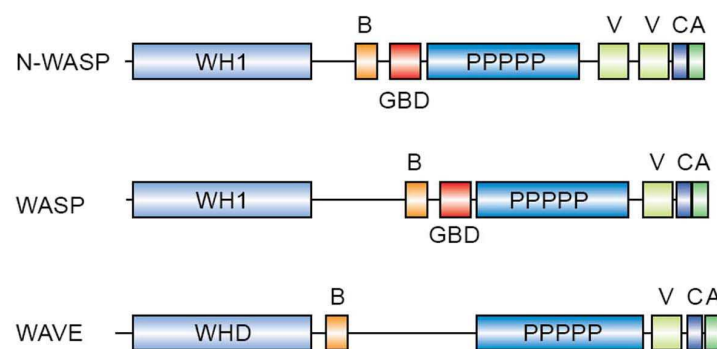


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der WASP/WAVE-Proteindomänen (Stradal, 2004).

Die Proteine der WASP/WAVE-Familie zeigen alle eine VCA-Domäne, für die Bindung des Arp2/3-Komplexes und Aktin (V: Verprolin-Homologie; C: 'connector' oder 'central'; A: 'acidic'), eine prolinreiche Region (PPPPP) für die Bindung von PIP_2 (N-WASP, WASP) oder PIP_3 (WAVE) sowie einen basischen Bereich (B), der Proteine, die SH3-Domänen aufweisen, und Profilin bindet. WASP und N-WASP besitzen eine zentrale GTPase-bindende Domäne (GBD), die den WAVE-Proteinen fehlt. Im Gegensatz zu WASP-Proteinen, die eine konservierte N-terminale WH1 Domäne haben, zeigt der N-Terminus von WAVE eine WAVE-Homologie Domäne (WHD).

Die im C-terminalen Bereich liegende VCA-Domäne besteht aus einer Verprolin-Homologie Domäne (V, auch als WASP Homologie (WH) 2 Domäne bezeichnet), die Aktinmonomere bindet, einer sauren (A für 'acidic') Region, die mit dem Arp2/3-Komplex interagieren kann; und einer konservierten Sequenz, die als 'connector'- oder 'central domain'- (C) bezeichnet wird. Die C-Domäne besitzt die Fähigkeit sowohl an Aktin als auch an den Arp2/3-Komplex zu binden, wobei eine gleichzeitige Bindung ausgeschlossen scheint. Es wird angenommen, dass die C-Domäne zunächst an den Arp2/3-Komplex bindet und damit die für die Aktivierung erforderliche Konformationsänderung des Komplexes (s. 1.3.1.4) mitbewirkt. Im folgenden Schritt löst sich die C-Domäne vom Arp2/3-Komplex, bindet ein Aktinmonomer und bringt dieses in die richtige Position für eine Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex. Im

Gegensatz zu WASP und den WAVE-Isoformen besitzt N-WASP zwei V-Domänen (Kim et al., 2000; Machesky and Insall, 1998; Marchand et al., 2001; Miki and Takenawa, 1998; Panchal et al., 2003; Stradal et al., 2004).

N-terminal der VCA-Domäne schließt sich eine prolinreiche Region, eine GB ('GTPase-binding')-Domäne sowie ein basischer Abschnitt (B) an, wobei den WAVE-Proteinen die GBD fehlt. Über die prolinreiche Region erfolgt die Bindung an Proteine, die z.B. eine SH3 (Src-Homologie 3)-Domäne enthalten, wie z.B. Nck, die oben erwähnte Bindung an Profilin oder an Ena/VASP-Proteine (Castellano et al., 2001). Die GBD in WASP und N-WASP interagiert direkt über ein CRIB ('Cdc42 and Rac interactive binding')-Motiv mit der aktivierten Form von Cdc42 ('Cell division cycle42') (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi et al., 2000). In neueren Studien wurde ebenfalls eine Interaktion von N-WASP mit Rac beschrieben (Tomasevic et al., 2007a). Die B-Region vermittelt vermutlich die Bindung an F-Aktin und Phosphoinositide- im Fall von WASP und N-WASP an PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und im Fall der WAVE-Proteine an PIP₃ (Rohatgi et al., 2000; Stradal et al., 2004; Suetsugu et al., 2001; Takenawa and Miki, 2001).

WASP und N-WASP besitzen im N-terminalen Bereich eine WH1 (WASP Homologie 1)-Domäne, die an Proteine der WIP-Familie ('WASP-interacting protein') bindet (Volkman et al., 2002). Etwa 80 % des zellulären (N)-WASP liegt in einem inaktiven Komplex mit WIP vor (de la Fuente et al., 2007; Sasahara et al., 2002). Der N-Terminus von WAVE-Proteinen weist keine großen Sequenzhomologien auf (WHD für WAVE Homologie-Domäne), welcher die Bindung an die WAVE-Komplex Untereinheiten Abi1 ('Abelson-interactor'1) und HSPC300 vermittelt (Innocenti et al., 2004).

WASP und N-WASP liegen in einer autoinhibierten Form vor. Ein aktuelles Modell der Aktivierung besagt, dass Signaltransduktionsadaptoren wie Toca1 ('transducer of Cdc42 dependent actin assembly') simultan WASP/N-WASP und GTP-Cdc42 binden und so die intramolekulare Blockade in WASP/N-WASP lösen. Die Bindung von PIP₂ und verschiedener weiterer Interaktionspartner trägt zur vollständigen Aktivierung bei (Prehoda et al., 2000; Stradal et al., 2004). Es wurde postuliert, dass N-WASP in einem Multiproteinkomplex zusammen mit Tuba, WIP, Toca1 und Cortactin seine Funktionen in der Zelle erfüllt (Kovacs et al., 2006), obwohl die Modalitäten der Aktivierung in verschiedenen Signalwegen noch unklar sind.

Im Gegensatz zu WASP und N-WASP sind unkomplexierte WAVE-Proteine konstitutiv aktiv. *In vivo* agiert WAVE im Signalweg unterhalb der RhoGTPase Rac (s. 1.3.3.1). Da WAVE aber nicht direkt an Rac binden kann, ist die Aktivität über einen Proteinkomplex gesteuert (Stradal and Scita, 2006). Dieser Komplex setzt sich aus den Proteinen Brick1/HSPC300, Abi ('Abelson-interactor'), Nap ('Nck-associated protein'), PIR/Sra ('specifically Rac-associated') und einer der WAVE-Isoformen in einem Verhältnis von 1:1:1:1:1 zusammen (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Steffen et al., 2004; Stovold et al., 2005). Fehlt eine Komponente des Komplexes, kommt es zu einer Degradation der übrigen Komponenten (Kunda et al., 2003; Pollitt and Insall, 2008; Rogers et al., 2003; Steffen et al., 2004). Die Regulation des WAVE-Komplexes erfolgt durch eine Reihe weiterer Faktoren wie z.B. durch Abl, einer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die sowohl WAVE als auch Abi phosphoryliert, Nck, das Nap bindet, sowie Irs53, das zu einer Rac-abhängigen Aktivierung des Komplexes zusammen mit PIP₃ führen kann (Dai and Pendergast, 1995; Fan and Goff, 2000; Leng et al., 2005; Stradal et al., 2004; Stuart et al., 2006; Suetsugu et al., 2006).

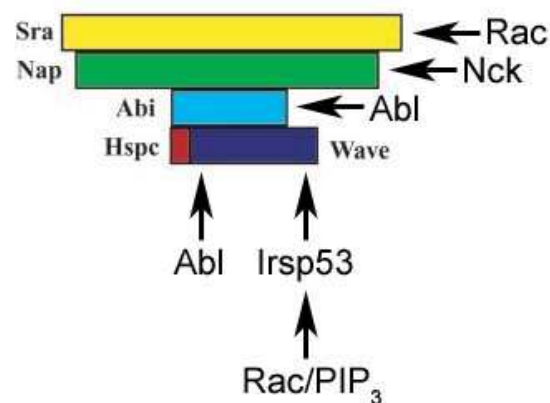


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus bzw. diverser Regulatoren des WAVE-Komplexes (Gautreau, 2004; modifiziert).

Der WAVE-Komplex setzt sich aus fünf Komponenten zusammen. Dabei handelt es sich um die Proteine Sra, Nap, Abi, HSPC300 und eine der WAVE-Isoformen. Die Aktivierung des Komplexes erfolgt u.a. durch extrazelluläre Stimuli, die zur Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac führen. Rac ist einer der Regulatoren des WAVE-Komplexes; weitere Regulatoren sind Irs53, Abl sowie Nck.

Generell kann die Regulation der WASP/WAVE-Proteine neben den bereits beschriebenen Prozessen u.a. durch 'clustering' oder durch Phosphorylierung beeinflusst werden (Arden et al., 2006; Danson et al., 2007; Leng et al., 2005; Padrick et al., 2008; Stuart et al., 2006).

N-WASP spielt eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. So führt der N-WASP 'knockout' in Säugerzellen zu einer moderaten Reduktion der Internalisierungsrate von Clathrin-Substraten, bei Hefen hingegen ist das Ortholog Las17 essentiell für die Aktinpatch-Bildung (Benesch et al., 2005; Innocenti et al., 2005; Li, 1997). Eine Rolle auf weiteren Endozytoserouten oder im Vesikelverkehr ist wahrscheinlich. Zudem ist N-WASP ein prominentes Target vieler Pathogene wie z.B. für enteropathogene *E.coli* (EPEC), die Reorganisation des Aktinzytoskeletts auf der Oberfläche von Zellen in Form von 'pedestals' induzieren, oder für die intrazelluläre Bewegung von Bakterien, wie Shigellen (Lommel et al., 2004; Lommel et al., 2001). N-WASP wird dagegen nicht für die Bildung von Lamellipodien bzw. Filopodien, und auch nicht für die Invasion von Salmonellen in nicht-phagozytotische Zellen benötigt (Benesch et al., 2002; Co et al., 2007; Hanisch et al.; Lommel et al., 2001; Snapper et al., 2001; Svitkina, 2007; Yamazaki et al., 2003).

WAVE2-defiziente Zellen weisen Defekte in der Zellmigration, im Ausbreiten ('spreading') und in der 'ruffle'- bzw. Lamellipodienbildung auf. Der 'knockout' von WAVE2 ist embryonal lethal, was auf essentielle Funktionen während der Embryonalentwicklung schließen lässt, u.a. wird eine Fehlbildung des Gehirns beobachtet (Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

In Bezug auf PDGF-induziertes 'ruffling' wurde beschrieben, dass N-WASP-defiziente Zellen in ihrer Fähigkeit zirkuläre 'ruffles' zu bilden beeinträchtigt sind, WAVE-Proteine indessen keine Rolle spielen (Legg et al., 2007). Für all diese Beobachtungen wurden Zellen aus Mäusen verwendet, bei welchen Gene (N-WASP, WAVE1 oder WAVE2) genetisch inaktiviert wurden. In einer anderen Arbeit wurde mit denselben Zellen beobachtet, dass WAVE1 wichtig für dorsale und WAVE2 essentiell für peripheres 'ruffling' ist (Suetsugu et al., 2003). Da jedoch WAVE1 und WAVE2 beide an der lamellipodialen Spitze lokalisieren (Hahne et al., 2001), impliziert dies deren funktionelle Redundanz in diesen Strukturen (Sossey-Alaoui et al., 2005; Yamazaki et al., 2005).

Für die meisten WAVE-Komplex-Komponenten wie Sra/PIR und Nap wurden schon Funktionen außerhalb des Komplexes postuliert (Anitei et al.; Schenck et al., 2001; Weiner et al., 2006). Dies gilt auch für die Abi-Proteine, was nicht überraschend ist, da Abi ein klassischer Signaltransduktionsadaptor ist und z.B. seine SH3-Domäne im Kontext des WAVE-Komplexes keine Rolle zu spielen scheint. So wurde bereits beschrieben, dass Abi in der Lage ist direkt mit N-WASP zu interagieren und zu aktivieren. Abi nimmt so ebenfalls einen Einfluss auf die N-WASP-Regulation bezüglich

des aktinbasierten Vesikeltransports oder der Internalisierung des EGF-Rezeptors. Zudem erfolgt eine direkte Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase p85 (s. 1.5.1) sowie mit den Proteinen Eps8 und Sos1; wobei das Letztere im Komplex mit Abi RacGEF-Aktivität zeigt. Abi kann also als ein 'scaffolding'-Protein wirken, das die Zusammenlagerung verschiedener multimolekularer Komplexe ermöglicht (Disanza et al., 2004; Innocenti et al., 2003; Innocenti et al., 2005; Scita et al., 1999; Stradal et al., 2004).

1.3.3 Ras-Superfamilie

Die Tumoronkoproteine H-Ras, K-Ras und N-Ras (Ras: 'Rat sarcoma') sind die Gründungsmitglieder einer großen Familie von kleinen GTPasen, die eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion in der Zelle spielen (Colicelli, 2004; DeFeo et al., 1981; Ellis et al., 1981; Repasky et al., 2004). Heute umfasst die humane Ras-Superfamilie über 150 Mitglieder und lässt sich aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und funktionellen Gemeinsamkeiten in fünf Hauptgruppen von kleinen monomeren GTPasen einteilen. Es gibt die Ras, Rho, Rab, Arf und RanGTPasen, wobei im Folgenden die RhoGTPasen eingehender betrachtet werden.

1.3.3.1 RhoGTPasen

Die Familie der kleinen RhoGTPasen umfasst im Säuger genom im Moment 20-22 Mitglieder, wobei Miro1 und 2 kürzlich eher ausgegliedert wurden. Rho ('Ras homologous') wurde 1985 entdeckt (Madaule and Axel, 1985) und seine Funktion in Zusammenhang mit der Regulation des Aktinzytoskeletts wenige Jahre später zum ersten mal beschrieben (Ridley and Hall, 1992).

Aufgrund der primären Aminosäuresequenz, von strukturellen Motiven sowie der zellulären Funktion erfolgt die Einteilung in mehrere Unterfamilien, deren Mitglieder ähnliche, aber nicht identische Eigenschaften aufweisen. RhoGTPasen haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 20 kDa, werden ubiquitär exprimiert (Aspenstrom et al., 2004; Raftopoulou and Hall, 2004; Wennerberg and Der, 2004) und weisen an ihrem C-Terminus ein sogenanntes CAAX-Motiv auf, wobei das C für Cystein, A für aliphatisch und X für eine beliebige Aminosäure steht. Das Cystein wird posttranslational prenyliert, wobei es sich um eine Farnesyl- bzw. um eine Geranylgeranyl-Isoprenoidmodifikation handelt.

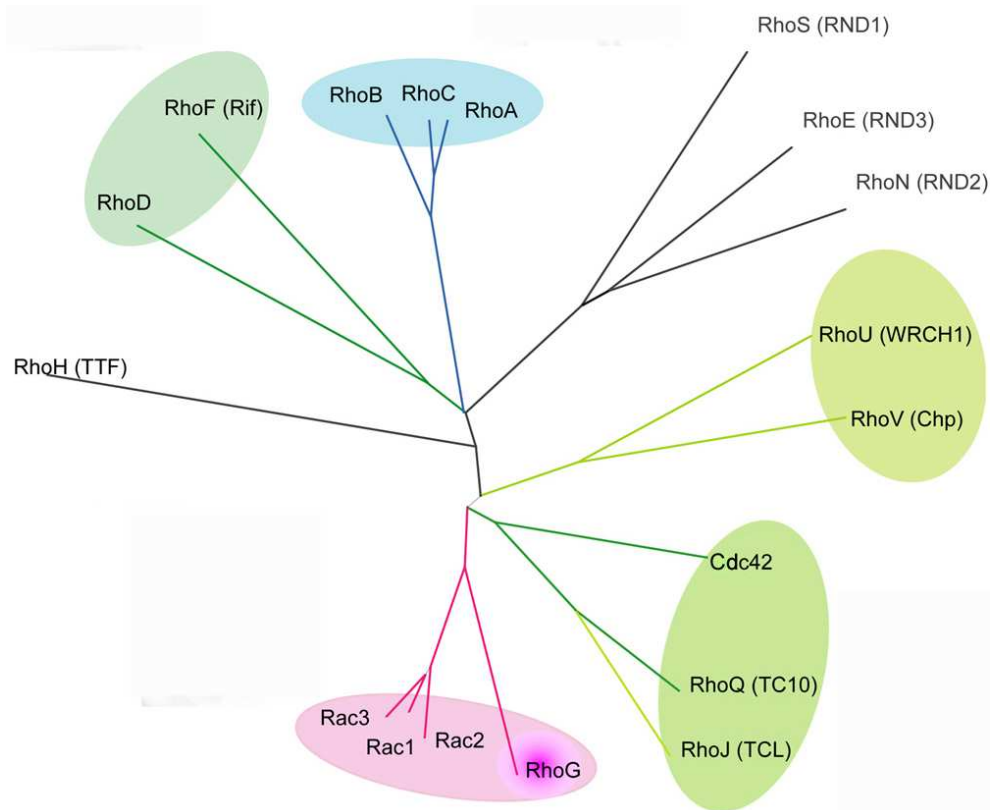


Abbildung 1.5: Phylogenetischer Stammbaum der RhoGTPasen und Repräsentanten der übrigen GTPasen der Ras-Superfamilie (Heasman und Ridley, 2008).

Basierend auf phylogenetischen Untersuchungen erfolgt die Einteilung der 20 Mitglieder der Rho-Familie in mehrere Untergruppen.

Zudem kann es zu einer proteolytischen Abspaltung des AAX-Motivs kommen, das durch eine Carboxy-Methylierung substituiert wird (Cox and Der, 2002; Wennerberg and Der, 2004). Der Prenyl-Rest trägt zur Erkennung der und Bindung an die Zielmembran und somit zur subzellulären Lokalisation bei und ist entscheidend für ihre biologische Funktion (Wennerberg and Der, 2004).

RhoGTPasen fungieren als molekulare Schalter bei der Kontrolle verschiedener Signalwege. Dabei wechseln sie zwischen einer inaktiven (GDP-gebundenen) und einer aktiven (GTP-gebundenen) Form.

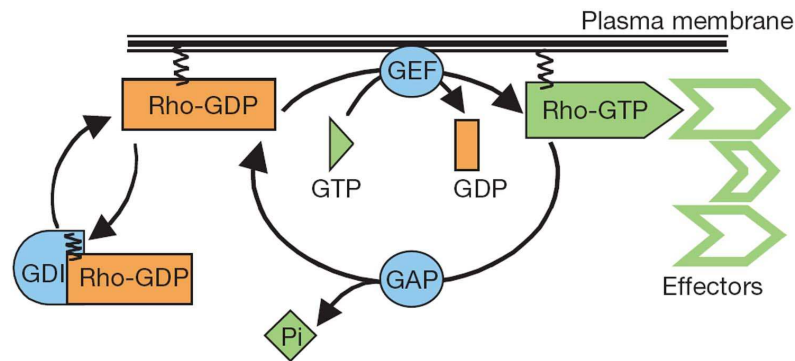


Abbildung 1.6: Der RhoGTPase-Zyklus (Etienne-Manneville und Hall, 2002).

RhoGTPasen wechseln zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. Dieser Zyklus wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende-Faktoren (GAPs) und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) reguliert. Die aktivierte GTPase kann an Effektorproteine wie z. B. Kinasen binden. Diese Bindung kann im Folgenden verschiedene zelluläre Antworten hervorrufen. Die Verankerung in die Membran erfolgt mittels des posttranslational angefügten Prenyl-Restes.

Dieser Wechsel wird wiederum von drei verschiedenen Proteingruppen reguliert. Dabei handelt es sich um GEFs ('guanine nucleotide exchange factors'), die den Austausch von GDP zu GTP fördern, um die GTPase in ihren aktiven Zustand zu überführen; sogenannte GAPs ('GTPase-activating proteins'), welche die intrinsische GTPase-Aktivität steigern, so dass es zur Hydrolyse des gebundenen Nukleotids kommt und die GTPase in die inaktive Form wechselt; die dritte Gruppe bilden die GDIs ('guanine nucleotide dissociation inhibitors'), die die Verteilung der RhoGTPasen zwischen dem Cytosol und der Membran steuern, in dem sie den hydrophoben C-Terminus der GDP-gebundenen Form der GTPase abschirmen und damit die Bindung an die Membran unterbinden (Hall, 1998; Raftopoulou and Hall, 2004; Ridley, 2006; Schmidt and Hall, 2002; Vetter and Wittinghofer, 2001).

RhoGTPasen kontrollieren diverse Signalwege, indem sie eine Verbindung zwischen Zelloberflächenrezeptoren und intrazellulären Komponenten herstellen. In ihrer aktiven Konformation interagieren RhoGTPasen mit einer Vielzahl von Effektoren. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellpolarität, der Transkription von Genen, während des Zellzyklus, in der Mikrotubulidynamik, im Vesikeltransport und in einer Auswahl an enzymatischen Aktivitäten; eine Schlüsselrolle spielen sie in der Regulation der Aktindynamik (Aspenstrom, 1999; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 1998). Zu den prominentesten Vertretern der kleinen RhoGTPasen zählen RhoA, Rac1 und Cdc42 (Aspenstrom, 1999).

In Swiss3T3-Zellen konnte gezeigt werden, dass **RhoA** durch die Zugabe von extrazellulären Stimuli wie dem Lipid LPA ('lysophosphatidic acid') aktiviert wird. Es wurde beobachtet, dass die RhoA-Aktivierung zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt, in dem die Bildung von Fokalkomplexen und kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten, den sogenannten Stressfasern (s. 1.2.1), induziert wird (Paterson et al., 1990; Ridley and Hall, 1992).

Ursprünglich erfolgte die Identifizierung von **Rac1** und **Rac2** ('Ras-related C3 botulinum toxin substrate') als Substrate des bakteriellen Toxins ADP-Ribosyltransferase (Didsbury et al., 1989; Hall, 1990; Polakis et al., 1989). Die Rac-Unterfamilie der kleinen RhoGTPasen besteht heute aus Rac1-3 und RhoG, wobei die Expression von Rac1 und RhoG weitgehend ubiquitär ist. Bei Rac2 handelt es sich um ein hämatopoetisch spezifisches Protein, wohingegen Rac3 verstärkt neuronal exprimiert wird, die Expression in Fibroblasten aber durch Wachstumsfaktoren induziert werden kann (Didsbury et al., 1989; Haataja et al., 1997; Moll et al., 1991; Ridley et al., 1992; Shirsat et al., 1990; Wennerberg and Der, 2004).

Rac spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von Signalkaskaden. Durch die Aktivierung der kleinen RhoGTPase u.a. durch Wachstumsfaktoren wie PDGF oder EGF kommt es zu einer schnellen Reorganisation des Aktinzytoskeletts und zur Bildung von Lamellipodien und Membran 'ruffles', des weiteren wird Makropinozytose induziert (Ridley et al., 1992). Die Rac-Aktivierung kann über verschiedene GEFs erreicht werden, die u.a. von der PI3-Kinase gesteuert werden (s. 1.5.1) bzw. kann durch RhoG über den ELMO/Dock180-Signalweg die Aktivierung von Rac vermittelt werden (deBakker et al., 2004; Katoh et al., 2006; Katoh and Negishi, 2003; Ravichandran and Lorenz, 2007). RacGEFs sind u.a. Tiam1, β Pix, Vav1 oder Asef und Alsln, die zur Familie der Dbl-GEFs gehören (Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002) (s. 1.5.1).

Zu Rac-Effektoren zählen z.B. die Serin-/Threoninkinase PAK, das Cdc42- und Rac-bindende Protein IQGAP, welches über CLIP170 eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli herstellen kann, oder Irs53 im Zusammenspiel mit dem WAVE-Komplex (s. 1.3.2) (Bosco et al., 2009; Brandt and Grosse, 2007; Brown et al., 1996; Frost et al., 1996; Fukata et al., 2002a; Manser et al., 1994).

Der Rac1-'knockout' ist in einem sehr frühen Stadium der Embryonalentwicklung lethal; so wird Rac1 beispielsweise für die Bildung der drei Keimblätter während der Gastrulation benötigt. Außerdem sind die Zelladhäsion und die Zellmigration, nicht aber die gerichtete Motilität, in Rac1-defizienten Zellen beeinträchtigt, was sich auf defiziente Lamellipodienbildung zurückführen lässt (Sugihara et al., 1998; Vidali et al.,

2006). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass Rac1-'knockout'-Zellen eine spindelförmige Morphologie aufweisen, dass sich in der Abwesenheit von Lamellipodien durch das Fehlen von Rac1 trotzdem Filopodien bilden können, und dass Rac1 wichtig für das Schließen von Wunden ist (Guo et al., 2006; Liu et al., 2009; Vidali et al., 2006).

Cdc42 ('cell division cycle 42') wurde anfänglich als ein Protein in der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben, dessen Mutation zu Defekten in der Knospung sowie der Polarität führt (Adams et al., 1990; Drubin, 1991; Johnson and Pringle, 1990). In Säugern werden zwei Splicevarianten von Cdc42 exprimiert; Cdc42Hs tritt ubiquitär auf, wohingegen sich die Expression von Cdc42b auf neuronale Gewebe beschränkt (Marks and Kwiatkowski, 1996; Nicole et al., 1999). Zu der Familie der Cdc42-verwandten Proteine gehören u.a. TC10 und TCL, die ebenso wie Cdc42 die Bildung von Filopodien, aktinreichen fingerähnlichen Strukturen, induzieren können (Bishop and Hall, 2000; Drivas et al., 1990; Vignal et al., 2000; Wennerberg and Der, 2004) (s. 1.2.3). Ob Cdc42 jedoch eine essentielle Funktion in der Filopodienbildung übernimmt wird z.Z. noch kontrovers diskutiert (Czuchra et al., 2005; Yang et al., 2006a).

Cdc42 kann wie Rac1 an der Membran von Membranrezeptoren eingehende Signale übermitteln, z.B. durch die Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF. Eine Stimulation der Rezeptoren mit extrazellulären Liganden kann die Aktivierung von Cdc42-spezifischen GEFs, wie z.B. Intersectin, Frabin oder Tuba führen (Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002). Aktives Cdc42 wirkt dann z.B. auf WASP und N-WASP, was wiederum durch die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt (Cerione, 2004; Etienne-Manneville, 2004b; Schiller, 2006; Stradal et al., 2004; Symons and Settleman, 2000). Eine weitere Gruppe direkter Effektoren von Cdc42, die direkt zur Aktinreorganisation führen, sind Mitglieder der Formin-Familie, welche zudem direkt in die Filopodienbildung involviert sind (Faix et al., 2009; Faix and Rottner, 2006). Nicht zuletzt ist auch die PAK-Kinase (s.o.) ein Cdc42-Effektor (Manser et al., 1994; Szczepanowska, 2009).

Der 'knockout' von Cdc42 ist embryonal lethal. Cdc42 defiziente Zellen zeigen reduziertes zirkuläres 'ruffling', wohingegen Lamellipodien bzw. 'ruffles' in der Zellperipherie in ihrer Bildung nicht beeinträchtigt sind. Außerdem kommt es in der Abwesenheit von Cdc42 zu einer Reduktion 'spike'-ähnlicher Protrusionen, was Beobachtungen entspricht, dass Cdc42 die Bildung von 'microspikes' induzieren kann. Nicht zuletzt ist Cdc42 in die Invasion von Bakterien wie *L. monocytogenes* in nicht-phagozytotische Zellen involviert (Bosse et al., 2007; Chen et al., 2000; Czuchra et al.,

2005; Kozma et al., 1995; Yang et al., 2006). Das genaue Verständnis von Cdc42 und seinen Funktionen wird dadurch erschwert, dass nur wenig über mögliche funktionale Redundanzen mit den eng verwandten GTPasen TC10 und TCI bekannt ist.

RhoGTPasen sind in der Lage sich gegenseitig zu beeinflussen; so kann z.B. Cdc42 Rac1 aktivieren, während Rac1 und Rho antagonistisch aufeinander wirken (Nobes and Hall, 1995; Rottner et al., 1999). Des weiteren sind für eine Reihe von GEFs der Dbl-Familie beschrieben, dass sie als Austauschfaktoren für mehrere RhoGTPasen fungieren können wie u.a. β PIX als GEF für Rac und Cdc42 bzw. Bcr oder Abr, die auf RhoA, Rac und Cdc42 wirken (Rossman et al., 2005).

1.4 Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Wachstumsfaktoren

Alle Zellen besitzen verschiedene Zelloberflächenrezeptorproteine. Diese wirken als Signalwandler, in dem sie ein extrazelluläres Signal in ein intrazelluläres umwandeln. Zelloberflächenrezeptoren werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Eine Hauptklasse bilden enzymgekoppelte Rezeptoren, zu denen u.a. die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) zählen.

RTKs spielen eine entscheidende Rolle bei vielen zellulären Prozessen, wie der Zellzykluskontrolle, der Migration, dem Metabolismus oder der Differenzierung. Alle RTKs besitzen eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne, die für gewöhnlich glykosyliert ist. Die ligandenbindende Domäne ist über eine einzelne Transmembrandomäne mit dem cytoplasmatischen Teil verbunden, welcher eine intrinsische Tyrosinkinasedomäne besitzt. Diese wird durch die Bindung eines spezifischen Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors aktiviert (Schlessinger, 2000). Durch die Aktivierung wird die Übertragung eines γ -Phosphats von ATP (Adenosintriphosphat) auf die Hydroxylgruppe des Tyrosins vom Zielprotein katalysiert (Hunter, 1998a). Das Zielprotein kann in dem Fall die RTK selbst sein; es handelt sich dann um eine sogenannte Autophosphorylierung. Als Substrat können aber auch intrazelluläre Signalproteine fungieren, was wiederum zur Aktivierung spezifischer Signalkaskaden führt.

Da in der vorliegenden Arbeit der durch PDGF-BB-induzierte Signalweg, der zur Aktivierung des Rezeptors führt, detaillierter charakterisiert werden sollte, wird im weiteren speziell auf diese RTK bzw. auf deren Liganden genauer eingegangen.

1.4.1 PDGF und der PDGF-Rezeptor

PDGF ('platelet-derived growth factor') wurde vor mehr als 30 Jahren als Bestandteil des Blutserums, nicht aber des zellfreien Blutplasmas, entdeckt (Kohler and Lipton, 1974; Ross et al., 1974; Westermark and Wasteson, 1976). Es handelt sich dabei um einen Wachstumsfaktor, der bei der Stimulierung von Blutplättchen, durch die einsetzende Blutgerinnung, aus deren α -Vesikeln freigesetzt wird (Kaplan et al., 1979). Die Identifizierung des PDGF-Rezeptors als eine Rezeptortyrosinkinase erfolgte in den darauffolgenden Jahren (Ek et al., 1982; Yarden et al., 1986).

Die PDGF-Familie zeigt auf eine Reihe von Zelltypen mesenchymalen sowie neuroektodermalen Ursprungs eine mitogene Wirkung (Heldin and Westermark, 1999) (Raines, 1990) und besteht aus PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, die von vier verschiedenen Genen kodiert werden. In ihrer aktiven Form liegen sie als Dimere vor, die über Disulfidbindungen kovalent miteinander verbunden sind und entweder als Homodimere oder aber, im Fall von PDGF-AB, als Heterodimer auftreten. Ihre Wirkung vermittelt sich über die Bindung an den PDGF-Rezeptor, der extrazellulär am N-Terminus 5 immunglobulinartige Domänen aufweist (Claesson-Welsh, 1994) und in zwei verschiedenen Isoformen, und zwar als α - oder β -Rezeptor, und in drei möglichen Kombinationen, und zwar als $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ oder $\alpha\beta$, auftreten kann (Kovalenko, Kazlauskas 2003) (Heldin et al., 1998). Das Expressionsmuster ist zelltypspezifisch. PDGF-empfindliches Verhalten findet sich z.B. in Fibroblasten, Gliazellen, neuronalen oder Epithelzellen (Heldin and Westermark, 1999).

Der PDGF-Rezeptor weist mehrere Tyrosine in seiner C-terminalen cytoplasmatischen Domäne auf und die Kinasedomäne des PDGF-R ist charakteristischerweise durch eine etwa 100 Aminosäuren lange, hydrophobe und nicht-katalytische Sequenz unterbrochen (Claesson-Welsh, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin⁸⁵⁷ im β -Rezeptor wichtig ist für die Autophosphorylierung der RTK, indem es eine entscheidende Funktion in der Regulation der katalytischen Aktivität der Kinase übernimmt. Eine Mutante des Tyrosin⁸⁵⁷ führt zu einer erniedrigten Kinaseaktivität (Fantl et al., 1989; Heldin et al., 1998; Kazlauskas and Cooper, 1989). Die durch die PDGF-Bindung induzierte Dimerisierung und Aktivierung des PDGF-R führt zu einer Phosphorylierung der Tyrosine, die infolgedessen verschiedene Signalmoleküle über deren SH2-Domäne binden können. Zu diesen Signalmolekülen zählt u.a. die PI3-Kinase, die an die Tyrosine an Position 740 und 751 binden kann (Heldin et al., 1998; Wennstrom et al., 1994b).

PDGF stimuliert u.a. die Reorganisation verschiedener Zytoskelettelemente (Mellstroom et al., 1983; Ridley et al., 1992; Valgeirsdottir et al., 1998). Ausschließlich für die Stimulierung des PDGF- β -Rezeptors mit PDGF-BB wurde beschrieben, dass es zu prominenten Reorganisationen des Aktinzytoskeletts in Form von Lamellipodien und Membran 'ruffles', an der Zellperipherie als auch auf der dorsalen Oberseite kommt, was mit dem Verlust von Stressfasern einhergeht (Eriksson et al., 1992; Mellstroom et al., 1983). Zusätzlich wurde beschrieben, dass auch die Behandlung mit PDGF-AB durch die Stimulation des PDGF- α/β -Rezeptors bzw. des PDGF- β -Rezeptors in Zellen zu einer Umstrukturierung von Aktin führen kann, die aber sehr viel schwächer ausfällt als im Vergleich zu den von PDGF-BB induzierten Effekten (Arvidsson et al., 1992; Hammacher et al., 1989), wobei die Bindung von PDGF-AB an den PDGF- β -Rezeptors noch umstritten ist.

1.5 Phospholipide und PI3-Kinasen

Bei der Phosphorylierung und Hydrolyse von Lipiden handelt es sich um entscheidende Vorgänge in der Signalübertragung extrazellulärer Stimuli hinein ins Cytoplasma (Divecha and Irvine, 1995; Liscovitch and Cantley, 1994). Phosphatidylinositol, die nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge an zellulären Phospholipiden ausmachen, übernehmen hierbei eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion als sekundärer Botenstoff bzw. als dessen Vorläufer (Cantley et al., 1991; Cantley and Cantley, 1995; Stephens et al., 1993). So zeichnet sich ihre Funktion u.a. dadurch aus als Substrate der Phospholipase zur Generierung von löslichen Inositolphosphaten beizutragen, bzw. nehmen sie durch direkte Interaktion mit diversen Signalmolekülen einen Einfluss auf deren Aktivität bzw. Lokalisation (Fruman et al., 1998). Die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen durch Lipidkinasen steuert u.a. diese Prozesse und die Familie der Phosphoinositid-3-(PI3)-Kinasen, die die Übertragung eines Phosphats an die 3. Position des Inositolrings der Phosphoinositole katalysieren, stellt eine prominente Gruppe dieser Enzyme dar. Es wurden eine Reihe von PI3-Kinasen identifiziert, die aufgrund struktureller und regulatorischer Unterschiede in drei Hauptklassen eingeteilt sind (Domin and Waterfield, 1997). Man unterscheidet dabei PI3-Kinasen der Klasse I, II und III, wobei die Klasse I noch weiter differenziert ist in IA und IB. Da die PI3-Kinase der Klasse IA, die überwiegend von Rezeptortyrosinkinasen bzw. Immunoglobulin G Rezeptoren aktiviert wird (Lindmo and Stenmark, 2006) in der vorliegenden Arbeit von

ausschlaggebender Relevanz war, wird infolgedessen auf die Struktur und die Funktion dieser Kinase näher eingegangen.

1.5.1 PI3-Kinase der Klasse IA

Die PI3-Kinase ist in fundamentale zelluläre Prozesse wie die Apoptose, die Proliferation, die Zellmotilität und die Adhesion involviert (Walker et al., 2000). Des weiteren wurde beschrieben, dass eine erhöhte Aktivität der PI3K mit verschiedenen Krebsarten wie kolorektalem bzw. Brustkrebs korreliert (Gershtein et al., 1999; Phillips et al., 1998).

Bei der PI3-Kinase handelt es sich um ein Heterodimer, das sich aus einer 85 kDa großen regulatorischen (p85) und einer katalytischen 110 kDa großen Untereinheit (p110) zusammensetzt (Min and Abrams, 2009; Schlessinger, 2000). Die regulatorische Untereinheit tritt in zwei Formen auf: p85 α und β , wobei p85 α in mehreren Splicevarianten vorkommt. Zu der katalytischen Untereinheit zählen p110 α , β und δ (Antonetti et al., 1996; Escobedo et al., 1991; Fruman et al., 1996; Hiles et al., 1992; Hu et al., 1993; Inukai et al., 1996; Inukai et al., 1997; Otsu et al., 1991; Skolnik et al., 1991; Vanhaesebroeck et al., 1997).

Die regulatorische Untereinheit p85 weist vom N-Terminus ausgehend eine SH3-(Src-Homologie3)-Domäne, eine zu beiden Seiten mit prolinreichen Regionen flankierten BCR-('breakpoint cluster region')-Domäne, die eine Bindung u.a. an Rac oder Cdc42 vermittelt (Tolias et al., 1995), sowie im C-terminalen Bereich zwei SH2-(Src-Homologie2)-Domänen auf. Die Region zwischen den SH2-Domänen wird als inter-SH2-Region bezeichnet; hier befindet sich die Bindungsstelle für die katalytische Untereinheit p110 (Hu et al., 1993; Kapeller and Cantley, 1994; Kapeller et al., 1994; Klippel et al., 1993), welche durch die p85-Bindungsstelle am N- und die katalytische Domäne im C-Terminus charakterisiert ist (Kapeller and Cantley, 1994).

In ruhenden Zellen hält die regulatorische Untereinheit p85 die katalytische Untereinheit p110 in einem niedrigen Aktivitätsstatus. Durch die Interaktion mit Phosphotyrosinen an aktivierten Wachstumsfaktorrezeptoren wie dem PDGF-R oder an Adapterproteinen über ihre SH2-Domänen wird die PI3K aktiviert. Die direkte Bindung an die GTPase Ras erhöht die PI3-Kinase-Aktivität noch weiter, und es kommt zu einer Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositid-3,4,5-Phosphat (PIP_3). Signalproteine mit PH-Domänen, wie die Akt Kinase (s. 1.6) oder GEFs für Rac bzw. Arf, akkumulieren an Stellen von erhöhter PI3-Kinase-Aktivität indem sie spezifisch an PIP_3 -reiche Membranabschnitte binden (Cantley, 2002; Lawlor and Alessi, 2001; Lemmon and Ferguson, 2000).

Terminiert wird die PI3K-vermittelte Signalgebung durch die Dephosphorylierung von PIP_3 von PTEN zu $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ bzw. von SHIP1/2 zu $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, zwei Phosphatasen, die die Aktivität der PI3-Kinase regulieren (Cantley, 2002).

Zur genaueren Untersuchung, welche Rolle die PI3-Kinase u.a. in Wachstumsfaktor-induzierten Signalkaskaden spielt, können spezifische Inhibitoren verwendet werden. Zwei der bekanntesten PI3-Kinase-Inhibitoren sind Wortmannin und LY294002 (Arcaro and Wymann, 1993; Vlahos et al., 1994). Wortmannin wurde das erste Mal aus *Penicillium wortmannii* isoliert (Brian, 1957), wohingegen es sich bei LY294002 um einen synthetisch hergestellten Inhibitor handelt, der auf dem Flavonoid Quercetin basiert (Vlahos et al., 1994). Beide Inhibitoren inhibieren die PI3-Kinase, in dem sie die ATP-Bindung an die Kinase unterbinden. Auf diese Weise kann das γ -Phosphat des ATP nicht abgespalten werden. Ein wesentlicher Unterschied in den Wirkungsmechanismen der beiden Inhibitoren ist, dass die kovalente Bindung von Wortmannin die Aktivität der PI3-Kinase irreversibel durch eine massive Konformationsänderung beeinträchtigt, während die Inhibition, die durch LY294002 verursacht wird, reversibel und kompetitiver Natur ist (Stein and Waterfield, 2000; Vlahos et al., 1994; Walker et al., 2000; Wymann et al., 1996). Jedoch ist bei der Verwendung von Kinaseinhibitoren generell zu beachten, dass sich die ATP-Bindestellen der Kinasen strukturell sehr ähnlich sind (Lindmo and Stenmark, 2006). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein vermeintlich spezifischer Inhibitor vor allem in höheren Konzentrationen auch andere Kinasen in ihrer Wirkung behindert. So konnte sowohl für Wortmannin als auch im Fall von LY294002 gezeigt werden, dass die Inhibitoren auch weitere Kinase in ihrer Aktivität beeinflussen (Arcaro and Wymann, 1993; Bonser et al., 1991; Brunn et al., 1996).

Es wurde bereits beschrieben, dass die PI3-Kinase durch den in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktor PDGF-BB aktiviert wird (Hawkins et al., 1995; Wennstrom et al., 1994a; Wennstrom et al., 1994b). Nach Aktivierung des PDGF-Rezeptors kommt es zu einer Bindung der SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit p85 an die Phosphotyrosine an den Positionen 740 und 751 (Klippel et al., 1992; Wennstrom et al., 1994b) und zu einem Anstieg von PIP_2 und PIP_3 (Auger et al., 1989; Fruman et al., 1998; Panayotou and Waterfield, 1992). Werden PDGF-Mutanten verwendet, die die PI3-Kinase nicht mehr binden können, zeigen die Zellen eine gestörte Chemotaxis (Kundra et al., 1994; Wennstrom et al., 1994a; Wennstrom et al., 1994b). Des weiteren konnte in Fibroblasten, in denen ein 'knockout' der beiden regulatorischen Varianten p85 α/β der PI3K durchgeführt wurde, beobachtet werden, dass die Zellen im PDGF-induziertem 'ruffling' eingeschränkt sind und eine verringerte

Rac-Aktivität aufweisen (Brachmann et al., 2005), was Daten bestätigt, dass die Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac zumindest zum Teil PI3K-abhängig ist (Hawkins et al., 1995; Kotani et al., 1995; Wennstrom et al., 1994a); u.a. durch die direkte *in vitro* Interaktion mit dem trimeren RacGEF-Komplex aus Abi1-Eps8-Sos1 (Lanzetti et al., 2004). Zusätzlich wurde postuliert, dass aktives Rac selbst zur PI3-Kinase Aktivierung beitragen kann (Inabe et al., 2002; Keely et al., 1997; Sachdev et al., 2002), also ein positiver 'feedback-loop' vorliegt (Srinivasan et al., 2003; Weiner et al., 2002).

1.6 Proteinkinase B (PKB oder Akt)

Bei der Proteinkinase B (PKB), die auch als Akt Kinase bezeichnet wird und zusammen mit der Proteinkinase A und C zu der Familie der AGC-Proteinkinasen zählt, handelt es sich um eine Serin-/Threoninkinase. Sie übernimmt Schlüsselfunktionen in verschiedenen Prozessen der Signaltransduktion; so wurde bereits postuliert, dass die PKB eine wichtige Rolle im Verlauf von Krebserkrankungen spielt, in dem sie die Proliferation von Zellen stimuliert und gleichzeitig die Apoptose unterdrückt (Lawlor and Alessi, 2001). Zudem soll die Akt Kinase einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen ausüben (Higuchi et al., 2001; Irie et al., 2005; Zhou et al., 2006).

Die drei beschriebenen Isoformen der PKB (PKB α , PKB β und PKB γ), die auch als Akt1, Akt2 und Akt3 bekannt sind, werden weithin exprimiert und besitzen alle eine N-terminale PIP₂- und PIP₃-bindende PH-Domäne, sowie eine katalytische Kinasedomäne am C-Terminus des Proteins (Lawlor and Alessi, 2001).

Die PKB weist *in vivo* vier potentielle Phosphorylierungsstellen auf, und zwar am Serin124 und 473 sowie am Threonin308 und 450 (Alessi et al., 1996). Die Phosphorylierung am Thr308 und Ser473 erfolgt durch extrazelluläre Stimuli, wohingegen Ser124 und Thr450 bereits basal phosphoryliert zu sein scheinen (Datta et al., 1999).

Die Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren wie PDGF führt zu einer PI3-Kinase-abhängigen Aktivierung der Akt Kinase (Franke et al., 1995; van Weering et al., 1998), wobei die N-terminale PH-Domäne für die Rekrutierung der PKB an die PIP₃-angereicherte Membran benötigt wird (Franke et al., 1995). An der Membran erfolgt die Phosphorylierung der Akt Kinase durch die PDK1 am Thr308, was jedoch in einer neueren Publikation in Frage gestellt wird (Ding et al.).

Eine vollständige Aktivierung der PKB wird nur erreicht, wenn PDK1 einen Komplex mit der PRK2 eingeht (Alessi et al., 1997a; Alessi et al., 1997b; Stokoe et al., 1997),

woraufhin die Phosphorylierung des Ser473 zur Dissoziation aus der Membran und zur Translokation der Akt Kinase in den Nukleus führt (Balendran et al., 1999; Lawlor and Alessi, 2001). Vermutlich ist die PKB fähig Substrate sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern zu phosphorylieren (Lawlor and Alessi, 2001). Zu diesen Substraten zählen u.a. BAD und GSK3- β , die an der Regulation der Apoptose bzw. der Proliferation beteiligt sind; des weiteren handelt es sich bei Aktin und bei Regulatoren des Aktinzytoskeletts wie den RhoGTPasen Rac und Cdc42 ebenfalls um potentielle Substrate der Akt Kinase (Enomoto et al., 2005; Lawlor and Alessi, 2001; Vandermoere et al., 2007). So konnte bereits gezeigt werden, dass aktives phosphoryliertes Akt an Orten der dynamischen Aktinreorganisation wie Membran 'ruffles' lokalisiert (Higuchi et al., 2001; Vandermoere et al., 2007) und die verschiedenen Isoformen Akt1 und Akt2 unterschiedliche Effekte auf die Zellmigration bzw. Membran 'ruffling' zeigen, was jedoch kontrovers diskutiert wird (Irie et al., 2005; Zhou et al., 2006). Überdies wurde beschrieben, dass sich Rac und Cdc42 in der Signalkaskade oberhalb der PKB befinden und zu dessen Aktivierung beitragen können (Genot et al., 2000; Higuchi et al., 2001), was, wie bei der PI3K, auf einen positiven 'feedback'-Mechanismus hindeutet (Lawlor and Alessi, 2001).

Die genauen Signalwege der PKB sind noch nicht verstanden und es bedarf weiterführender Untersuchungen.

1.7 Endozytose

Der Vorgang der Endozytose beschreibt die fortwährende oder induzierte Aufnahme von Membranproteinen und Lipiden, Pathogenen, extrazellulären Liganden und löslichen Molekülen von der Oberfläche in die eukaryotische Zelle. Dabei sind die in die Endozytose involvierten Prozesse sehr heterogen und umfassen die Nährstoffaufnahme, das Recycling von synaptischen Vesikeln, die Regulation der Expression von Zelloberflächenrezeptoren, die Remodelierung der Plasmamembran sowie die Erzeugung von Zellpolarität (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

Grundsätzlich werden je nach Größe der gebildeten endozytotischen Vesikel zwei Haupttypen der Endozytose unterschieden: die Pino- und Phagozytose. Die Pinozytose umfasst die Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Molekülen sowie kleinerer Vesikel, wohingegen die Phagozytose die Aufnahme von großen z.B. apoptotischen Vesikeln, Pathogenen oder Partikeln vermittelt (Alberts, 2005). Endozytose kann kontinuierlich oder aber durch die Bindung bestimmter Signalmoleküle an entsprechende Membranrezeptoren induziert erfolgen. Die Form der Endozytose, die

wohl am besten charakterisiert ist, ist die Clathrin-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose, bei der gezielt Makromoleküle in Clathrin-beschichtete Vesikel in die Zelle aufgenommen werden. Zusätzlich gibt es eine Fülle Clathrin-unabhängiger endozytotischer Signalwege, die sich in ihren molekularen und morphologischen Vermögen unterscheiden, wie z.B. die Makropinozytose oder die Aufnahme durch sogenannte 'lipid Rafts' und 'Caveolae' (Johannes and Lamaze, 2002).

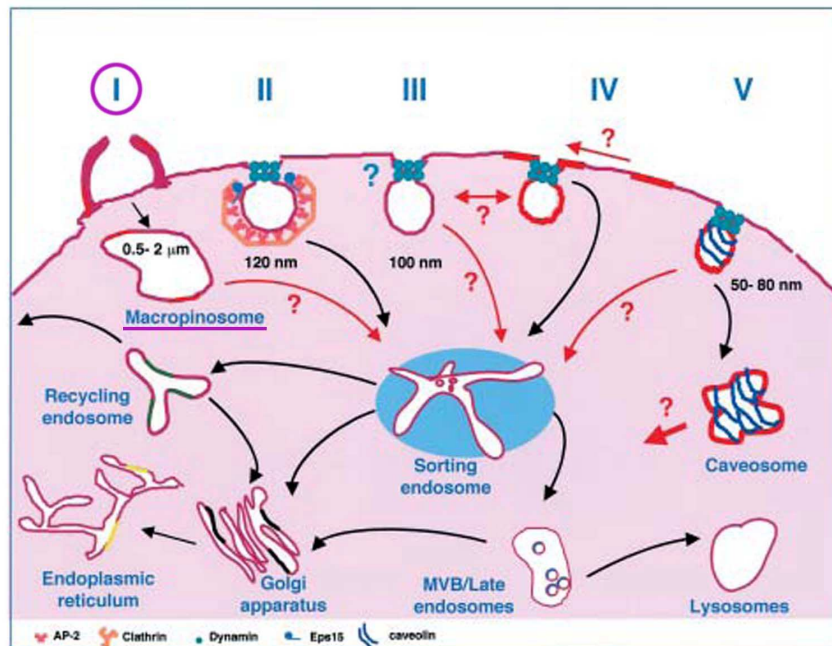


Abbildung 1.7: Endozytische Signalwege in Säugerzellen (Johannes und Lamaze, 2002).

Neben der wohl am besten charakterisierten Clathrin-vermittelten Endozytose (II), sind weitere Clathrin-unabhängige endozytotische Signalwege dargestellt. (I) Makropinozytose, (III) nichtbeschichtete Einstülpungen und Mikrodomänen der Membran wie (IV) 'Lipid Rafts' oder (V) 'Caveolae'. Die schwarzen Pfeile deuten auf etablierte intrazelluläre Signalwege, wohingegen die mit rot gekennzeichneten Pfade weniger untersucht sind.

Zirkuläres 'ruffling' (s. 1.2.2), das in dieser Arbeit detaillierter untersucht wurde, wird u.a. mit dem Prozess der Makropinozytose in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund wird im weiteren speziell auf diese Form der Endozytose näher eingegangen.

1.7.1 Makropinozytose

Die Makropinozytose wurde 1931 von Warren Lewis in Makrophagen entdeckt und Pinozytose genannt (Lewis, 1931). Die genauere Charakterisierung und damit auch die Umbenennung in Makropinozytose erfolgte Jahre später (Brunk et al., 1976) (Fawcett,

1965). Makropinozytose beschreibt einen Clathrin-unabhängigen, aber Aktin-abhängigen Prozess, der sowohl spontan als auch durch die Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren wie HGF, EGF oder PDGF induziert werden kann, wobei es zu starken Membranauffaltungen kommt (Buccione et al., 2004; Johannes and Lamaze, 2002; Swanson and Watts, 1995). Die Makropinosomenbildung führt zu einer Aufnahme großer Membranamengen, die zuvor z.T. aus endosomalen Signalwegen zur Verfügung gestellt wurden (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998), von der Zelloberfläche, was darauf schließen lässt, dass die Makropinozytose in Prozesse des Recyclings bzw. der Rezeptorinternalisierung involviert ist (Johannes and Lamaze, 2002; Orth et al., 2006; Orth and McNiven, 2006). In Makrophagen wurden außerdem nach Eindringen von Bakterien wie Legionellen und Salmonellen oder Viren wie HIV Makropinosomen gefunden (Alpuche-Aranda et al., 1994; Marechal et al., 2001; Watarai et al., 2001), was auf einen Beitrag in der Immunabwehr schließen lässt (Sallusto et al., 1995). Jedoch wird das Schicksal der einmal gebildeten Makropinosomen zurzeit noch kontrovers diskutiert (Jones, 2007; Swanson and Watts, 1995).

Im Gegensatz zu Clathrin-vermittelter Endozytose, bei der gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche Vesikel von einer definierten Größe im Durchmesser von etwa 85-110 nm entstehen, bilden sich Makropinosomen, die eine sehr heterogene Größe von 2-10 µm aufweisen, an Orten der dynamischen Aktinreorganisation in Form von Membran 'ruffles' (Swanson, 2008; Swanson and Watts, 1995). Aus einem sich schließenden dorsalen 'ruffle' entstehen jedoch nicht immer Makropinosomen.

Des weiteren wurde postuliert, dass u.a. die Aktivität der PI3-Kinase bzw. der kleinen RhoGTPase Rac einen Einfluss auf die Bildung von Makropinosomen nehmen kann (Araki et al., 1996; Doherty and McMahon, 2009; Miaczynska and Stenmark, 2008; Ridley et al., 1992; West et al., 2000). Behandlung von Zellen mit Amilorid, die zu einer Erhöhung des zytosplasmatischen, aber einer Erniedrigung des submembranen pH-Werts führt und mit der Regulation von Rac und Cdc42 interferiert, resultiert in einer Hemmung der Makropinozytose (Koivusalo et al.), welches durch die Aufnahme von sogenannten Markern der Flüssigphase, wie fluoreszenzmarkiertem Dextran, untersucht werden kann (Ahram et al., 2000; Oliver et al., 1984). Außerdem sind neben den RhoGTPasen Rac und Cdc42 noch weitere GTPasen der Ras-Superfamilie wie Rab5 bzw. Rab35 und Arf6 in den Prozess der Makropinozytose impliziert (Brown et al., 2001; Lanzetti et al., 2004; Palamidessi et al., 2008; Sun et al., 2003).

1.8 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind Zytoskelettfilamente, denen eine Rolle in diversen zellulären Vorgängen wie in der strukturellen Formgebung der Zelle, in der Lokalisierung von Organellen, in der Chromosomensegregation und im intrazellulären Vesikeltransport zugeschrieben wird (Verhey and Gaertig, 2007).

Mikrotubuli sind aus globulären Untereinheiten, den α - β -Tubulin Heterodimeren aufgebaut. Die Dimere, die sich aus zwei strukturell sehr ähnlichen Proteinen zusammensetzen, sind über nicht kovalente Bindungen fest miteinander verknüpft (Wade, 2009) (Alberts, 2005). Ein Protofilament ist durch die Anlagerung von Dimeren, bei der sich α - und β -Tubulin abwechseln, charakterisiert, wobei jedes Protofilament aus einer linearen Kette von Tubulinuntereinheiten besteht. Die hohle röhrenartige Struktur des Mikrotubulus, die einen Durchmesser von etwa 25 nm zeigt, besteht aus 13 parallelen Protofilamenten. Die Filamente der Mikrotubuli weisen, wie bereits ebenfalls für Aktinfilamente beschrieben (s. Abschnitt 1.1), eine deutliche Polarität auf, wobei das β -Tubulinende als das schneller wachsende (+)-Ende und das α -Tubulinende als das langsamer wachsende (-)-Ende bezeichnet wird und beide Enden unterschiedliche chemische und physiologische Eigenschaften aufzeigen (Alberts, 2005) (Wade, 2009).

Ein weiteres Tubulin ist das γ -Tubulin, das 1989 entdeckt wurde und zu ungefähr 30 % zu α - bzw. β -Tubulinen identisch ist (Oakley and Oakley, 1989). Es ist in die Nukleation sowie in die Stabilisierung von Mikrotubuli involviert und lokalisiert in der Region des MTOC (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) (Dutcher, 2003; Oakley, 1992), das als Ursprung bzw. als Keimbildungsstelle der Mikrotubuli gilt und in unterschiedlichen Strukturen in Erscheinung treten kann wie z.B. dem Zentrosom in tierischen Zellen oder den Basalkörpern in Cilien und Flagellen (Alberts, 2005). Das MTOC ist nahe des Nukleus lokalisiert; die (+)-Enden der Mikrotubuli wachsen von hier aus vom MTOC in Richtung der Zellperipherie. Für Mikrotubuli charakteristisch ist der Prozess der dynamischen Instabilität, bei der es entweder zu einem schnellen Wachstum der Mikrotubuli kommt oder zu einem Schrumpfen, der sogenannten Katastrophe der Röhrenstrukturen. Mit dieser Eigenschaft besitzen sie die Fähigkeit sich schnell an sich ändernde Bedingungen anzupassen.

In die Dynamik von Mikrotubuli kann mit verschiedenen Substanzen eingegriffen werden, die entweder stabilisierend wirken, also deren Depolymerisation hemmen, wie z.B. Taxol (Paclitaxel) und Epothilon, oder die Depolymerisation dieser Zytoskelettkomponente bedingen wie z.B. Colchizin, Nocodazol und Vinblastin.

An den Mikrotubuli entlang erfolgt der Transport von Proteinkomplexen, Vesikeln und auch Organellen durch die Motorproteine der Familien der Kinesine und Dyneine (Ross et al., 2008). Des Weiteren werden die verschiedenen Tubuline zur besseren Regulierung ihrer Funktion unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen wie Tyrosinierung/Detyrosinierung, Acetylierung, Glutamylierung, Phosphorylierung oder Palmitoylierung unterzogen (Ikegami and Setou).

1.8.1 Mikrotubuli und das Aktinzytoskelett

Die Elemente des Zytoskeletts müssen koordiniert reguliert werden, damit sie ihre Funktion u.a. in der Zellmigration, der Adhesion und der Zellteilung erfüllen können. Zusätzlich zu den gut definierten Aufgaben der einzelnen Komponenten des Zytoskeletts, gibt es einen intensiven 'crosstalk' zwischen den Systemen und überlappende Aufgaben, so wie z.B. die des Aktins beim Transport von Membranen oder der Mikrotubuli bei der Beeinflussung von protrusiven und kontraktilen Kräften. Dabei findet dieser 'crosstalk' sowohl direkt als auch von Signalmolekülen vermittelt statt (Etienne-Manneville, 2004).

Wird in die Dynamik der Mikrotubuli eingegriffen, kommt es zu einem veränderten Migrationsverhalten in den meisten Zelltypen (Etienne-Manneville, 2004). Jedoch gibt es ebenfalls Beispiele, in denen die Depolymerisation der Mikrotubuli keinen Effekt zeigt (Euteneuer and Schliwa, 1984) bzw. die Motilität sogar gesteigert ist (Keller et al., 1984). Zudem wurde beschrieben, dass es nach der Depolymerisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes zu einem Verlust der Polarität, zu Kontraktion der Zellen, aber auch zu ungerichteter Membran 'ruffling' kommt (Chang et al., 2008; Goldman, 1971; Liu et al., 1998; Vasiliev, 1991; Vasiliev et al., 1970). Nach Nocodazol-, nicht aber Taxolbehandlung wurden sowohl große Lamellipodien als auch Stressfasern beobachtet (Liu et al., 1998; Mikhailov and Gundersen, 1998).

In zellulären Protrusionen können bezüglich der Aktin- bzw. der Mikrotubulifilamente zwei Regionen unterschieden werden. Zum einen gibt es Bereiche, die besonders reich an Aktin sind, wie die gebündelten Aktinfilamente in den sogenannten Filopodien und das dichte Netzwerk in Lamellipodien und 'ruffles', wo sich selten oder nie Mikrotubuli finden. Dem gegenüber steht die mikrotubulireiche Zone im Zellzentrum, in welcher die Mikrotubuli strahlenförmig vom Zentrosom ausgehend und mit dem (+)-Ende in Richtung der Zellperipherie zeigen. Aktinreiche Strukturen treten hier im wesentlichen in Form von Stressfasern auf (Etienne-Manneville, 2004). So findet der Transport von Cargo (Leng et al., 2005; Oikawa et al., 2004; Takahashi and Suzuki, 2008) in Richtung Zellperipherie erst an Mikrotubuli entlang durch Kinesine vermittelt

statt. An einem bestimmten Punkt kreuzen sich Mikrotubuli und Aktinfilamente, wobei es zur Übergabe der Fracht kommen kann, was auch mit einem Wechsel der Motorproteine, von Kinesin zu Myosin, einhergeht. Bei endozytischen Prozessen verläuft der Vorgang in umgekehrter Richtung (Ross et al., 2008; Watanabe and Higuchi, 2007).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass wichtige Signalmoleküle, die mit der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Zusammenhang stehen, wie die kleinen RhoGTPasen Rac und Cdc42 (Brandt and Grosse, 2007; Fukata et al., 2002b; Hart et al., 1996; Kuroda et al., 1996), oder Aktinnukleatoren aus der Forminfamilie ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Mikrotubuliorganisation spielen können (Bartolini et al., 2008; Lewkowicz et al., 2008; Wen et al., 2004) und damit eine Verbindung zwischen den beiden Elementen des Zytoskeletts darstellen.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten PDGF-induzierte molekulare Mechanismen, die zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen, näher charakterisiert werden. Im Vordergrund stand dabei die detaillierte Untersuchung potentieller Unterschiede in den Signalkaskaden, die die Ausbildung verschiedener aktinreicher Strukturen entweder in der Zellperipherie, sogenannter peripherer 'ruffles', oder auf der dorsalen Plasmamembran der Zelle, sogenannter zirkulärer dorsaler 'ruffles', zur Folge haben. Verwendet wurden zum einen bereits etablierte murine Fibroblasten-Zellsysteme wie z.B. Cdc42 oder N-WASP Kontroll- und 'knockout'-Zellen (Czuchra et al., 2005; Lommel et al., 2001; Snapper et al., 2001); zum anderen erfolgte die Herstellung und Charakterisierung von Abi1 defizienten Zelllinien aus konditionalen 'knockout' Mäusen in enger Kooperation mit Dr. Leszek Kotula (NYBC). Nicht zuletzt wurde die Relevanz verschiedener bekannter und potentieller Mitspieler, wie der kleinen RhoGTPase Rac, der WAVE-Komplex-Komponente Nap1 und des Markerproteins für 'microspikes' bzw. Filopodien Fascin mit Hilfe der transienten Herunterregulation durch RNA-Interferenz im Fibroblastensystem eingehender analysiert. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren sollten die Rollen der PI3-Kinase, der Akt Kinase sowie von Mikrotubuli genauer betrachtet werden. Durch verschiedene mikroskopische Techniken wurde die durch PDGF-Stimulation induzierte Aktinreorganisation und Änderung der Morphologie der Plasmamembran dokumentiert und Proteine, die in peripheren bzw. dorsalen 'ruffles' lokalisieren, identifiziert. Durch das Aussäen der Zellen in eine Collagen-Matrix sollte schließlich in einer dreidimensionalen Umgebung die *in vivo* Situation

nachempfunden werden, um zu überprüfen, ob eine PDGF-bedingte Bildung zirkulärer 'ruffles' möglicherweise ein physiologisches Korrelat hat, oder nur unter zweidimensionalen Kulturbedingungen auftritt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, BioRad, Biosource, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Cell Signaling, Dianova, Fermentas, Fluka, Gibco, Höchst, Invitrogen, InvivoGen, Life Technologies, Macherey-Nagel, Merck, Millipore, Molecular Probes, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Quiagen, Roche Diagnostics, Roth, Santa Cruz, Sigma-Aldrich, Stratagene, Tebu-Bio, Upstate, sowie Zeiss bezogen. Alle Substanzen haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgerade 'p.a.' bzw. 'reinst'. Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde.

2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli: TG2 (Stratagene)

2.3 Bakterienkulturmedien und Zusätze

Alle Medien für die Bakterienkultur wurden durch Autoklavieren (30 min, 120 °C, 1.1 bar) sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten wurden sterilfiltriert (Steritop, Millipore) und dem autoklavierten Medium hinzugegeben.

LB-Medium (Luria Bertani broth):	Bacto-Trypton	10 g/L
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	120 mM

Agarplatten: 8 g Bacto-Agar in 0.5 L LB-Medium

Nach Abkühlen des autoklavierten Agarmediums auf ca. 45 °C konnten sterilfiltrierte Antibiotikastammlösungen hinzugefügt und das Medium in Petrischalen gegossen werden.

Ampicillin	100 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL
Zeocin	25 µg/mL

2.4 Zellkultur

2.4.1 Medien und Lösungen

Alle Medien für die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Steritop, Millipore, 0.45 µm) und anschließend bei 4 °C kühl gelagert. Vor Gebrauch wurden die Medien bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Das FCS wurde vor Verwendung bei 56 °C für 40 min hintzeinaktiviert.

Medien:

- Wachstumsmedium (WM) 1:

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium, Gibco)	4.5 g/L Glucose
FCS 048K3396 (Sigma-Aldrich), hitzeinaktiviert	10 %
L-Glutamin (Gibco)	2 mM
nicht essentielle Aminosäuren (Gibco)	0.1 mM
Natriumpyruvat (Gibco)	1 mM
- Wachstumsmedium (WM) 2:

DMEM Glucose (Gibco)	1 g/L
FCS 101K3361 (Sigma-Aldrich), hitzeinaktiviert	10 %
L-Glutamin (Gibco)	2 mM
- Wachstumsmedium (WM) 3:

Wachstumsmedium 1 mit	
Penicillin (Gibco)	50 U/mL
Streptomycin (Gibco)	50 µg/mL
Gentamycin (Sigma-Aldrich)	50 µg/mL
- Einfriermedium (EM):

Wachstumsmedium der jeweiligen Zelllinie mit	
FCS (Sigma-Aldrich), entsprechend der Zelllinie	10 %
DMSO (Sigma-Aldrich)	10 %

- Verhungerungsmedium (VM):

(1) DMEM	4.5 g/L
(2) DMEM	1 g/L

Lösungen:

PBS (Phosphate-Buffered-Saline), pH 7.4:

NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM

Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S):

Penicillin	5000 U/mL
Streptomycin	5000 µg/mL

Gentamycin-Lösung: 50 mg/mL

Zeocin-Lösung: 100 mg/mL

2.4.2 Verwendete Zelllinien

Folgende murine Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Beschreibung	Herkunft	WM
39	Cdc42 flox/del, Maus-Fibroblasten	Cord Brakebusch, Universität Kopenhagen, DK	1
397, 399	Cdc42 del/del, Maus-Fibroblasten	Cord Brakebusch, Universität Kopenhagen, DK	1
Klon1	N-WASP flox/flox, Maus-Fibroblasten	Lommel et al., 2001	2
1H51	N-WASP del/del, Maus-Fibroblasten	Lommel et al., 2001	2
R2	N-WASP wt/wt, Maus-Fibroblasten	Scott Snapper, Massachusetts, General Hospital, Harvard Medical School, USA	2
R6	N-WASP del/del, Maus-Fibroblasten	Scott Snapper, Massachusetts, General Hospital, Harvard Medical School, USA	2
Abi1 # 3, 8	Abi1 flox/flox, Maus-Fibroblasten	Leszek Kotula, New York Blood Center, USA	1

Abi1 KO # 3-6, 3-11; # 8-7, 8-11	Abi1 del/del, Maus-Fibroblasten	diese Arbeit	1
-------------------------------------	------------------------------------	--------------	---

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Zelllinien.

WM = Wachstumsmedium.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Plasmide

pEGFP-C1,-C2,-C3,-N1,-N2,-N3 (Clontech)

Diese Plasmide kodieren für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), das sowohl N- als auch C-terminal an das zu untersuchende Genprodukt fusioniert werden kann. Als Fusionsprotein mit anderen Komponenten, z.B. Aktin, lässt sich die Dynamik der Proteine *in vivo* verfolgen.

Der Vektor eignet sich zudem besonders gut für eine Selektion der transfizierten Zellen mittels eines Zellsortierers (s. 2.7.18).

psiRNA und pG-Super

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit psiRNA (InvivoGen) bzw. pG-Super Plasmide (Brummelkamp et al., 2002) verwendet, die einen transienten 'knockdown' eines bestimmten Proteins durch RNA-Interferenz vermitteln (s. 2.7.11). Sie kodieren u.a. für die entsprechende shRNA sowie für GFP.

Folgende Konstrukte/Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Konstrukt	AR	Beschreibung	Spezies	Herkunft
psiRNA h7SK GFPzeo	zeo	Kontrolle der psiRNA Konstrukte; kodiert für GFP	-	Invivogen
psiRNA h7SK gz WASP	zeo	Kodiert für GFP und die 'knockdown'-Sequenz für N-WASP	Mm, Hs	Invivogen
psiRNA h7SK gz Rac1	zeo	Kodiert für GFP und die 'knockdown'-Sequenz für Rac1	Mm	Invivogen
psiRNA h7SK gz Nap1	zeo	Kodiert für GFP und die 'knockdown'-Sequenz für Nap1	Mm, Hs	Invivogen
pG-Super Fascin Th	amp	Kodiert für GFP und die humane 'knockdown'-Sequenz für Fascin	Hs	Vignjevic et al., 2006
pG-Super Fascin Tc	amp	Kodiert für GFP und die murine/humane	Mm, Hs	Vignjevic et al., 2006

		'knockdown'-Sequenz für Rac1		
pEGFP-C1	kana	EGFP-Kontroll Plasmid	-	Clontech
pEGFP-C1 N-WASP	kana	Kodiert für ein EGFP-N-WASP- Fusionsprotein	Mm	S.Lommel
pPur	amp, puro	Kodiert für eine Puromycin-Resistenz	-	Clontech
pCre Pac	amp	Kodiert für die Cre-Rekombinase	P1 Bakteriophagen	Taniguchi et al., 1998

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Konstrukte.

AR = Antibiotika-Resistenz für die Selektion von Bakterien; amp = Ampicillin; kana = Kanamycin; puro = Puromycin; zeo = Zeocin; Mm = *M.musculus*; Hs = *H.sapiens*

2.5.2 Oligonukleotide/Primer

Folgende Oligonukleotide/Primer wurden in dieser Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Sequenz in 5'→ 3'	Verwendung
FlankNeo13'	GGGCAGACGGCGAGAAGCAGAG	Genotypisierung
mAbi1Intr15'	CGATACAGGAAGTGGCCGCCTTGAG	Genotypisierung
mAbi1loxP35'	AATAATTTAATAGTTCTGGTGATATGACAGC	Genotypisierung

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Primer.

2.5.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen auf eine 3 cm Schale so ausgesät, dass sie nach 48 h 90-100 %-ige Konfluenz aufwiesen. Das Medium wurde durch abgießen entfernt. Anschließend wurden die Zellen, nach Zugabe von 500 µL Zelllysispuffer, von der Kulturschale geschabt und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Inkubation bei 55 °C für 2-3 h. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1.5 mL 100 % EtOH hinzugefügt und invertiert, wodurch es zur Fällung der DNA kommt. Durch die sich anschließende Zentrifugation bei 4500 rpm

bei RT für 10 min wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen und danach für ca. 10 min getrocknet. Um die genomische DNA zu lösen wurden 200 µL ddH₂O hinzugegeben.

Zelllysispuffer:	Tris-HCl, pH 8.5	100 mM
	EDTA	5 mM

SDS	0.2 %
NaCl	200 mM
Proteinase K	500 µg/mL

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes, wobei ein Oligonukleotid/Primer-Paar an gegenläufig komplementäre DNA-Stränge bindet.

Die PCR-Reaktion besteht aus wiederholten Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Elongation. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 94 bzw. 95 °C denaturiert. Anschließend binden die im Überschuss zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 65 °C an die DNA-Stränge. Bei der Elongation bindet dann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 68-72 °C an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich nach jedem Zyklus.

Bei der Auswahl der Primer ist zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperatur zwischen den eingesetzten Primern nicht größer als 2 °C ist und bei ca. 60 °C liegt. Die Anzahl der Nukleotide sollte 20-30 betragen und der GC-Gehalt bei ca. 50 % liegen. Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein, da diese im Gegensatz zu Adenin und Thymin drei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden.

Bei guanin-/cytosinreichen Sequenzen stellt sich oft das Problem, dass die DNA-Denaturierung bei 95 °C nicht vollständig ist. Daher wurde zu den PCR-Ansätzen 3 % DMSO hinzugefügt, da DMSO denaturierende Wirkung zeigt.

PCR-Ansatz:	Genomische DNA	0.1 – 0.2 µg
	dNTP-Mix (10x)	2.5 µL
	PCR-Puffer (10x)	2.5 µL
	DMSO 3%	0.75 µL
	5' Primer (10 µM)	2.0 µL
	3' Primer (10 µM)	2.0 µL
	Taq Polymerase (50x)	0.5 µL
	ddH ₂ O auffüllen auf	25 µL

PCR-Programm:	(1)	94 °C	1 min
	(2)	94 °C	30 s
	(3)	64 °C	30 s
	(4)	72 °C	2 min
	(5)	Wiederholung von Schritt (1-4) für vier Zyklen	
	(6)	94 °C	30 s
	(7)	64 °C	30 s
	(8)	72 °C	3 min
	(9)	Wiederholung von Schritt (6-8) für 30 Zyklen	
	(10)	72 °C	5 min
	(11)	4 °C	∞

Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, mit der man Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe mittels einer angelegten elektrischen Spannung in einer Gelmatrix auftrennen kann. Die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Weitere Faktoren, die die Geschwindigkeit der DNA/RNA-Wanderung bestimmen, sind die Stromstärke des elektrischen Feldes, die Pufferbedingungen und die Agarosekonzentration.

Zur Sichtbarmachung der DNA in der Agarosematrix wird der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der unter UV-Licht rötlich fluoresziert. Ethidiumbromid ist eine interkalierende Substanz, d.h. sie bindet an DNA und kann sich reversibel in die Basenabfolge einlagern.

Die Größen der DNA-Banden können durch den Vergleich mit einem entsprechenden Marker festgestellt werden.

Für DNA-Gele wurde SeaKem®LE Agarose (BioWhittaker Molecular Applications, USA) mit einer Endkonzentration von 0.8-2 % in 1 X TAE-Puffer in der Mikrowelle

aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0.1 µg/ml zugegeben und die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen.

Nach Erkalten wurde das Gel in eine Gelkammer überführt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde entfernt, die Proben mit 1/5 Volumen 5 x DNA-

Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Standardmarker zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V. Nach Anlegen des elektrischen Feldes wandert die negativ geladene Nukleinsäure auf den positiven Pol zu. Nach ausreichender Trennung der DNA-Fragmente wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten.

5x DNA-Ladepuffer:	Ficoll	30 % (v/v)
	EDTA pH 8	50 mM
	SDS	0.5 % (w/v)
	50 x TAE-Puffer pH 7.5	20 µl
	Bromphenolblau	0.05 % (w/v)
	Xylencyanol FF	0.05 % (w/v)
	H ₂ O	auf 1 ml
50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA):	Tris-Base	2 M (pH 7.5)
	Na-Acetat	1 M
	EDTA	50 mM

DNA-Marker: SmartLadder (Eurogentec)

2.5.6 Transformation von *Escherichia coli*

Bei der Transformation handelt es sich um eine Methode, mit der man Fremd-DNA (meist Plasmid-DNA) in kompetente *E.coli*-Zellen einbringt. Durch einen kurzen Hitzeschock kommt es zu einer Destabilisierung der Membran, so dass die DNA in das Zytoplasma gelangen kann. Die anschließende Kultur wird auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert, so dass nur selektiv solche Kolonien wachsen können, die über die Aufnahme der Plasmid-DNA eine Antibiotikaresistenz erhalten haben.

100 µL kompetenter *E.coli*-Zellen (TG2) wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit ~100 ng Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig vermischt und 15 min auf Eis inkubiert.

Darauf wurde ein kurzer Hitzeschock bei 42 °C für 1-1.5 min durchgeführt. Nach Zugabe von 900 µL LB-Medium erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 60 min unter Schütteln. Die nun transformierten Bakterien wurden auf Selektivmediumplatten ausplattiert und ü./N. bei 37 °C inkubiert.

2.5.7 Midi/Maxi-Plasmid-DNA-Präparation

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurde die Plasmid-DNA entsprechend der Herstellerangaben für Midi- bzw. Maxi-Präparation der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

2.5.8 Fotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Bereich des Absorptionsmaximums. Die gemessene OD der DNA sollte im linearen Bereich (0.1-1) liegen. Als Referenz wird Wasser eingesetzt.

Eine OD_{260} von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA.

Zur Berechnung gilt daher: $OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50 = c_{\text{DNA}}$ in µg/mL

Aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} , bei der Proteinlösungen vermessen werden, erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen und damit über die Reinheit der präparierten DNA. Eine proteinfreie Lösung sollte ein Verhältnis (OD_{260}/OD_{280}) von 1.8-2 aufweisen.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Farbstoffs 'Precision Red' (Cytoskeleton) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen, die entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Gelsystem aufgetrennt werden.

Proteine binden das anionische Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit einem konstanten Ladungs- zu Masseverhältnis. SDS denaturiert die Proteine und durch vorherige zusätzliche Reduktion mit β -Mercaptoethanol werden bestimmte Protein-Proteinwechselwirkungen, vor allem Disulfidbrücken, unterbunden.

Bei der SDS-PAGE wandert der negativ geladene SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zur positiv geladenen Kathode und wird in einer Polyacrylamidmatrix entsprechend seiner molekularen Größe aufgetrennt.

Für diese Arbeit wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli verwendet. Dieses Gelsystem besteht aus zwei unterschiedlichen Komponenten; hierbei überschichtet ein Sammelgel, in dem die aufzutrennenden Proteine ankonzentriert werden, ein Trenngel, in dem die Proteine dann entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Gele unterscheiden sich u.a. durch ihren pH-Wert und ihre Porösität.

Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 180 V erhöht.

Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt (s. 2.6.3) oder für einen Western Blot (s. 2.8.1) verwendet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Acrylamidlösung:	Acrylamid	30 % (w/v)
	N,N-Methylenbisacrylamid	0.8 % (w/v)

Es wurde die fertige Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) verwendet.

Sammelgel (7.5 %):	H ₂ O	1.8 mL
	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	320 μ L
	Acrylamidlösung	330 μ L
	10 % SDS-Lösung	25 μ L

Trenngel :	10 %	12.5 %	15 %
H ₂ O	2.5 mL	1.75 mL	1.45 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Acrylamidlösung	2 mL	2.75 mL	3.05 mL

	10 % SDS-Lösung	60 µL	60 µL	60 µL
	TEMED	8 µL	8 µL	8 µL
	25 % APS	8 µL	8 µL	8 µL
Elektrophoresepuffer:	Tris-Base		25 mM	
	Glycin		192 mM	
	SDS		0.1 % (w/v)	
4 x SDS-Probenpuffer (PP):	10 % SDS		4 mL	
	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)		600 µL	
	H ₂ O		2.8 mL	
	Glycerin		4 mL	
	β-Mercaptoethanol		400 µL	
	5 % Bromphenolblau (w/v)		100 µL	
Molekulargewichtsmarker:	Page Ruler™ Prestained Protein Marker			
	(Fermentas)			

2.6.3 Coomassiefärbung

Das Gel bzw. die PVDF-Membran wurde 30 min in der Färbelösung geschwenkt, anschließend kurz für 5 min mit Wasser gespült und solange entfärbt, bis die angefärbten Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant blue (R250)	0.1 % (w/v)
	Isopropanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	H ₂ O	65 % (v/v)
Coomassie-Entfärber:	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	40 % (v/v)
	H ₂ O	50 % (v/v)

2.6.4 GLISA

Der GLISA (Cytoskeleton) ist eine neue auf Absorption basierende, Methode zur Bestimmung der Aktivitätslevels der kleinen GTPasen Rac und Cdc42 (auch für RhoA erhältlich).

Es wird die Eigenschaft der PAK-PBD-Domäne genutzt, dass diese spezifisch nur die aktivierte Form der GTPasen bindet; d.h. die PAK-PBD wird an die Oberfläche einer 96 well-Platte gekoppelt. Das vorbereitete Zelllysat wird in die 96 well-Platte gegeben, wobei nur Rac-GTP bzw. Cdc42-GTP an die PAK-PBD bindet. Die nicht aktivierte GTPase wird bei den nachfolgenden Waschschritten von der Platte entfernt. Die Menge an aktiviertem Rac bzw. Cdc42 wird mittels eines spezifischen ersten Antikörpers und eines Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers detektiert und fotometrisch vermessen.

Das Experiment wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Standardkultur

Die Zellen wurden in oberflächenbehandelten sterilen Gewebekulturschalen (Corning) mit dem Durchmesser von 10 cm in 10 mL des entsprechenden Mediums kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C in einer 7.6 %-igen (v/v) CO₂-Atmosphäre (39, 397, 399, Abi1 # 3, Abi1 KO # 3-6, Abi1 KO # 3-11, R2, R6) bzw. 32 °C in einer 5 %-igen (v/v) CO₂-Atmosphäre (Klon1, 1H51).

2.7.2 Separation und Transfer

Haben adhärent wachsende Zellen eine bestimmte Konfluenz erreicht, müssen sie enzymatisch oder mechanisch vom Substrat der Kulturschale, durch Trennen der Zell-Matrix-Verbindungen, abgelöst werden. Die weitere Kultivierung erfolgt verdünnt in einem neuen Kulturgefäß.

Die enzymatische Behandlung wird mit Trypsin-EDTA durchgeführt. Bei Trypsin handelt es sich um eine Protease; bei EDTA um einen Komplexbildner, der zweiwertige Kationen wie Magnesium und Calcium komplexiert, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Anheftung der Zellen aneinander und an die Oberfläche des Kulturgefäßes spielen.

Die Zellen wurden zunächst einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen und danach solange mit Trypsin-EDTA inkubiert, bis sich der Großteil der Zellen sichtbar abgerundet hatte, was etwa einer Zeit von 3-5 min entsprach. Durch die Zugabe von vorgewärmtem frischem Medium wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden dann mit einer Pipette abgespült, vereinzelt, abzentrifugiert (1000 rpm, RT) und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen konnten dann in der gewünschten Dichte in einem neuen Kulturgefäß ausgesät werden.

2.7.3 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen über längere Zeit zu konservieren, hat man die Möglichkeit, diese in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Hierfür fügt man dem Medium DMSO hinzu, das die Bildung von größeren Eiskristallen unterbindet, die die Zellen schädigen würden.

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium resuspendiert, abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min) und das Zellpellet in kaltem Einfriermedium (s. 2.4.1) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu 1 mL Aliquots in Kryoröhrchen portioniert und zunächst bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

Für diese Zählkammer gilt:

Fläche eines Großquadrats:	$1\text{ mm} \cdot 1\text{ mm} = 1\text{ mm}^2$
Höhe bei aufgelegtem Deckglas:	0.1 mm

Dies ergibt ein Volumen von 0.1 μL . Um die Zellzahl pro mL zu bestimmen, wird die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat ermittelt und diese mit 10^4 multipliziert. Die Gesamtzellzahl ergibt sich, unter Berücksichtigung der Verdünnung der Suspension, aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro mL.

2.7.5 Aussäen von Zellen in eine Collagen-Matrix

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene, auf Collagen basierende, Systeme verwendet, um die Zellen in einer 3D-Matrix zu untersuchen. Collagen ist das häufigste Protein in humanen und tierischen Geweben und bildet den wesentlichen strukturellen Bestandteil der extrazellulären Matrix.

Zum einen wurden CCC ('Collagen Cell Carrier'; PAA) und zum anderen ein 3D Collagen Zellkultur System (Millipore) ausgetestet. Mit diesen Systemen sollte die dreidimensionale Umgebung der extrazellulären Matrix nachempfunden werden, um das Verhalten der Zellen in der *in vivo* Situation zu analysieren.

Die Experimente wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.6 Makropinozytose-Experiment

Makropinozytose beschreibt einen Clathrin-unabhängigen, aber Aktin-abhängigen endozytotischen Prozess. Dabei werden entweder kontinuierlich oder Wachstumsfaktor-induziert nicht selektiv große Flüssigkeitsmengen von der Zelle aufgenommen, was zur Bildung großer Vakuolen bzw. Makropinosomen mit einem Durchmesser von 0.5-10 μm führt. Makropinozytose wird sowohl von peripheren Membrankräuselungen als auch von zirkulären dorsalen 'ruffles' vermittelt, wobei das Volumen, das über zirkuläres 'ruffling' aus der Umgebung aufgenommen wird, größer ist.

Um zu untersuchen ob Zellen in ihrer Fähigkeit Makropinosomen zu bilden beeinträchtigt sind, wird fluoreszenzmarkiertes FITC-Dextran, ein Polysaccharid, zum Nachweis verwendet (Cao et al., 2007; Oliver et al., 1984; Swanson, 2008).

Dazu wurden die Zellen in einer 6 well-Platte so ausgesät, dass sie nach 48 h eine Konfluenz von etwas 80-90 % aufwiesen. Einen Tag nachdem die Zellen ausgesät wurden, erfolgte die Verhungerung ü./N. für 16-18 h (s. 2.7.13). Im Anschluss an die Verhungerung wurden die Zellen mit PDGF-BB (s. 2.7.17) stimuliert; zusätzlich wurde das FITC-Dextran (SIGMA-Aldrich) in einer Konzentration von 0.5 mg/mL hinzugefügt. Die Zellen wurden für etwa 20 min, bei 37 °C und 7.6 % CO₂, mit der PDGF/Dextranmischung inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x mit 1 x PBS gewaschen, um nicht aufgenommenes Dextran zu entfernen. Um die Zellen von der 6 well-Platte zu lösen, erfolgte die Behandlung mit Trypsin (s. 2.7.2). Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation in einem entsprechenden Volumen an Wachstumsmedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bis zur Vermessung am FACS (s. 2.7.18) auf Eis gestellt.

Der generelle Versuchsansatz für die verwendeten Zelllinien entspricht dem folgenden Schema, wobei Ansatz1 als interne Kontrolle für den zweiten Ansatz, und Ansatz3 als interne Kontrolle für den vierten Ansatz gewertet wurde:

1	2	3	4	
-	-	+	+	PDGF
-	+	-	+	Dextran

Die Analyse des Makropinozytose-Experiments wurde direkt am FACS über die Intensität der Fluoreszenz, die proportional zur aufgenommenen Menge an FITC-fluoreszenzmarkiertem Dextran ist, vorgenommen. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

2.7.7 'killing curve'

Mit der sogenannten 'killing curve' soll diejenige Konzentration an Selektionsantibiotikum, in diesem Fall an Puromycin, ermittelt werden, bei der nach 48 h nach Zugabe 99 % der Zellen abgestorben sind.

In dieser Arbeit wurden Abi1 (fl/fl) # 3 bzw. Abi1 (fl/fl) # 8 Fibroblasten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Puromycin behandelt. Als Konzentrationen wurden 0, 1, 2, 3, 5 und 10 µg/mL Puromycin gewählt, wobei sich 5 µg/mL an Puromycin als die geeignete Konzentration zur Selektion erwies.

2.7.8 Cre-Rekombinase vermittelte Gendeletion

In den von Dr. Leszek Kotula (NYBC, NYC, USA) erhaltenen Abi1(fl/fl) Zelllinien (# 3, # 8), bei denen es sich um murine Fibroblasten handelt, sollte mittels des Cre/loxP-Systems die partielle Deletion des Abi1-Gens erfolgen.

Das Cre/loxP-System ermöglicht das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen. Dabei katalysiert das Enzym Cre, bei dem es sich um eine Rekombinase handelt, die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen. Diese Erkennungssequenz wird als loxP bezeichnet.

Dieser Prozess wird in der Molekularbiologie dazu genutzt, gezielt Gene bzw. bestimmte Abschnitte eines Gens mit loxP-Sequenzen zu versehen, und wird als floxen (fl) bezeichnet. Die Cre-Rekombinase erkennt und bindet spezifisch die jeweiligen loxP-Stellen; sind diese in gleicher Richtung orientiert, schneidet sie die entsprechende DNA-Sequenz heraus. Die Deletion eines kompletten Gens bzw. eines bestimmten

Abschnitts bewirkt damit ebenfalls meist das Fehlen der entsprechenden mRNA und auch des entsprechenden Proteins.

In dieser Arbeit wurden die Abi1 # 3 bzw. Abi1 # 8 Kontrollfibroblasten entweder mit dem pCre Pac Plasmid, der für die Cre-Rekombinase kodiert und eine Puromycin-Resistenz vermittelt, oder mit dem Plasmid pPur als entsprechende Kontrolle transfiziert. Durch die Zugabe von Puromycin 24 h nach der Transfektion wurden alle diejenigen Zellen getötet, die nicht transfiziert worden sind, da sie keine Puromycinresistenz aufwiesen. Die erforderliche Puromycin-Konzentration von 5 µg/mL wurde in einem vorangegangenen Experiment, der sogenannten 'killing curve', ermittelt (s. 2.7.7). Die Puromycinselektion erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektion des Plasmids pCre Pac vermittelt die Expression der Cre-Rekombinase, die in diesem Fall in den geflochten Abi1 Zellen zur Deletion des Exon1 des Abi1-Gens führen sollte. Die Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pPur diente als Kontrolle, so dass die parallel etablierten Zellen gleich behandelt worden sind.

Nach einer Selektionsdauer von fünf Tagen wurden die Kontrollzellen unter normalen Bedingungen als Mischpopulation weiterkultiviert. Die vermutlichen Abi1-KO-Zellen wurden für eine Einzelklon-Etablierung ausgesät.

2.7.9 Einzelzellklonierung

Das Ziel der Einzelzellklonierung besteht darin, aus einer bestehenden Mischpopulationen an Zellen, Zellklone zu etablieren, die aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind. Dazu wendet man das Prinzip der 'limited dilution' an, d.h. eine Zellsuspension wird in aufeinanderfolgenden Schritten so verdünnt, dass letztendlich 200 µL mit 0.5 Zellen je well in eine 96 well-Platte mit einer Mehrkanalpipette ausgesät werden. Die Zellen beginnen durch Teilung einen Klon zu bilden. Nach gegebener Zeit werden die Zellen auf eine größere Gewebeschale transferiert, solange bis man erste Zellsuspensionen einfrieren bzw. Zellen für die weitere Charakterisierung aussäen kann.

2.7.10 Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode, mit der man fremde DNA (meist Plasmid-DNA) in die eukaryotischen Empfängerzellen einschleust.

Die Transfektion eignet sich sowohl für einen stabilen Transfer, bei dem der Einbau der DNA ins Genom erfolgt, als auch für einen transienten Transfer, bei dem die Fremd-DNA für einen bestimmten Zeitraum episomal verbleibt.

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen sind verschiedene Methoden entwickelt worden, wie z.B. die Calciumphosphat-Methode, die Elektroporation oder die Mikroinjektion.

Die Zellen wurden in dieser Arbeit mit dem Transfektionsreagens FuGENE 6 (Roche) transfiziert.

Die entsprechende, zu transfizierende DNA wurde durch Plasmidpräparation aufgereinigt (s. 2.5.7). Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 60-80 % konfluent waren.

FuGENE Transfektionsansatz:

	100 mm Schale	6 well-Platte	4 well-Platte
OptiMem	600 µL	100 µL	25 µL
FuGene6	36 µL	6 µL	1.5 µL
DNA	10 µg	2 µg	0.5 µg

Der Ansatz wurde 30-40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden dann 10 mL Wachstumsmedium 1 zum Transfektionsansatz gegeben. Das Medium, das sich bis zu diesem Zeitpunkt auf den zu transfizierenden Zellen befand, wurde abgenommen und gegen den Transfektionsansatz ersetzt. Die Transfektionszeit betrug 36-48 h.

2.7.11 RNA-Interferenz zur Regulation der Genexpression

RNA-Interferenz ist ein natürlich vorkommender Mechanismus der Genregulation in eukaryotischen Zellen, der einen Einfluss auf die Genexpression hat. Vermittelt wird dieser Prozess durch 'small interfering RNAs', sogenannte siRNAs. Dabei handelt es sich um kurze doppelsträngige RNA Fragmente mit einer Länge von 21-23 Basenpaaren. Diese Fragmente entstehen durch die Aktivität des Enzyms 'Dicer'. Ein weiteres Enzym nimmt im folgenden einen Strang der siRNA auf, woraufhin sich der 'RISC'-Komplex bildet. Diejenigen mRNAs, die komplementär zu der jetzt einzelsträngigen siRNA sind, werden gebunden. Diese Bindung führt dazu, dass die entsprechende mRNA degradiert und im weiteren nicht translatiert wird. Bei diesem Prozess handelt es sich um ein posttranskriptionales 'gene silencing', der auch als

'knockdown' bezeichnet wird, d.h. die Expression eines spezifischen Gens wird noch vor der Translation der mRNA zum entsprechenden Protein unterbunden.

Dieses Verfahren wird sich in der Molekularbiologie zu Nutze gemacht, um gezielt in die Regulation bestimmter Gene einzugreifen. Es besteht zum einen die Möglichkeit synthetisch hergestellte siRNA-Duplexe mittels Transfektion in die Zellen einzubringen; als Alternative dazu können Plasmide, die für sogenannte 'small hairpin' RNAs (shRNAs) kodieren, transfiziert werden. Diese Plasmide kodieren für eine 'sense' und eine 'antisense' RNA-Sequenz, die durch eine 'linker'-Region miteinander verbunden sind. Die in den eukaryotischen Zellen entstehende lineare RNA, die komplementäre Sequenzen aufweist, formt eine sogenannte 'hairpin'-Schleufe, so dass doppelsträngige RNA entsteht, die dann wiederum, wie oben beschrieben, weiterprozessiert wird.

In dieser Arbeit wurde die RNA-Interferenz durch Transfektion verschiedener shRNAs vermittelt. Um den Zeitpunkt eines effizienten 'knockdowns' zu bestimmen, wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten, die ebenfalls für EGFP kodieren, transfiziert (s. Tabelle 2.2 und 2.7.10) und anschließend mittels des Zellsortierers (s. 2.7.18) angereichert. Es wurde eine Zeitreihe erstellt, die Aufschluss darüber gibt, zu welchem Zeitpunkt die Expression des entsprechenden Proteins am stärksten herunterreguliert wurde. Dazu wurden Zellextrakte (s. 2.7.12) der transfizierten Zellen 2-5 Tage nach der Transfektion angefertigt, die mittels Western Blot (s. 2.8.1), Immunfärbung und Chemolumineszenz (s. 2.8.2) analysiert wurden.

Folgende 'knockdown'-Konstrukte und entsprechende 'knockdown'-Sequenzen wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zielgen	Sequenz in 5'→ 3'	Konstrukt
N-WASP (Mm/Hs)	GAAATCACAACAAATAGATTT	psiRNA h7SK gz WASP
Rac1 (Mm)	GCAGACAGACGTGTTCTTAAT	psiRNA h7SK gz Rac1
Nap1 (Mm/Hs)	ACCAGATTGCTGCAGCTTTGTT	psiRNA h7SK gz Nap1
Fascin (Hs)	Vignjevic et al., 2006	pG-Super Fascin Th
Fascin (Mm/Hs)	Vignjevic et al., 2006	pG-Super Fascin Tc

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten 'knockdown'-Konstrukte und der entsprechenden 'knockdown'-Sequenzen.

Mm = *M.musculus*; Hs = *H.sapiens*

2.7.12 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten aus eukaryotischen Zellen wurde entsprechend der Konfluenz der Zellen und der Größe des Kulturgefäßes ein entsprechendes Volumen an 4 x Probenpuffer (s. 2.6.2) verwendet; z.B. wurden konfluente Zellen in einer 4 well-Platte in 20-30 µL, konfluente Zellen in einer 10 cm Schale in einem Volumen von 200-300 µL 4 x Probenpuffer aufgenommen. Durch Zugabe des Probenpuffers wurden die Zellen lysiert. Der Zellextrakt wurde anschließend 10 min bei 95 °C aufgeköcht und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.7.13 Verhungierung von Zellen

Um in eukaryotischen Zellen eine deutlich verstärkte Reaktion als Folge einer Stimulierung mit Wachstumsfaktoren (hier z.B. mit PDGF) beobachten zu können, ist es nötig, diese für eine angemessene zelltypspezifische Zeit ohne Zusatz von Serum oder anderen Mediumkomponenten zu behandeln, da im Serum bereits Wachstumsfaktoren enthalten sind. Werden den Zellen diese Komponenten entzogen, spricht man von einer Verhungierung der Zellen.

Die Zellen wurden dafür zunächst 2 x mit Verhungierungsmedium gewaschen. Die Verhungierung erfolgte ü./N. 16-18 h (für 39, 397, 399, Abi1 # 3, Abi1 KO # 3-6, Abi1 KO # 3-11) bzw. 24 h (für Klon 1, 1H51, R2, R6) unter normalen Kulturbedingungen. Die Zellen wurden dann entweder direkt mit PDGF stimuliert (s. 2.7.17), oder es erfolgte eine vorangehende Behandlung mit entsprechenden Inhibitoren (s. 2.7.16), an die sich im folgenden die PDGF-Stimulierung anschloss. Des weiteren wurden die Zellen für die Lebendzellmikroskopie weiterverwendet (s. 2.10).

2.7.14 Inhibitoren

Verwendete Inhibitoren:

- LY294002
- Wortmannin
- AktIV-Inhibitor
- Nocodazol

Bei LY294002 handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Vlahos et al., 1994).

Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 100 mM in DMSO vor.

Wortmannin ist ein weiterer Inhibitor der PI3-Kinase (Brian, 1957). Wird Wortmannin in höheren Konzentrationen eingesetzt, inhibiert es u.a. auch die Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI4K), die Proteinkinase C (PKC), die 'Mitogen-Activated Protein Kinase' (MAPK) oder die 'Myosin Light Chain Kinase' (MLCK) (Ferby et al., 1996; Vanhaesebroeck et al., 2001).

Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 1 mM in Methanol vor.

Der AktIV-Inhibitor unterbindet die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt (auch Proteinkinase B, PKB). Der Inhibitor hemmt eine Kinase, die sich in der Hierarchie dieses Signalweges oberhalb von Akt, aber unterhalb der PI3-Kinase befindet; vermutlich handelt es sich dabei um die Kinase PDK1 (Kau et al., 2003).

Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 5 mM in DMSO vor.

Nocodazol führt durch die Bindung an β -Tubulin zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli (Hoebeke et al., 1976); dabei handelt es sich um eine reversible Reaktion.

Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 2 mg/mL in DMSO vor.

2.7.15 Funktionstest der Inhibitoren

Um sicher zu stellen, dass die verwendeten Inhibitoren funktionsfähig waren bzw. dass die eingesetzte Konzentration ausreichend war, wurden Funktionstests durchgeführt.

Im Fall der PI3-Kinase-Inhibitoren kann die Funktionalität mittels der Serin/Threoninkinase Akt ermittelt werden. Ist die PI3-Kinase aktiv, wird Akt (an Serin 473) in einem Signalweg unterhalb der PI3-Kinase phosphoryliert; konnte die PI3-Kinase inhibiert werden, ist kein phosphoryliertes Akt mehr nachweisbar. Die notwendige Konzentration von LY294002 wurde über eine Konzentrationsreihe ermittelt.

Im Fall des AktIV-Inhibitors wurde entsprechend der PI3-Kinase-Inhibitoren verfahren. Verschiedene Konzentrationen des Inhibitors bzw. Inkubationszeiten wurden getestet, und die Funktionalität mittels des Phosphorylierungsstatus der Akt Kinase kontrolliert.

Im Fall von Nocodazol wurde die Wirksamkeit des Inhibitors mittels Immunfluoreszenz überprüft. Eine Behandlung der Zellen mit Nocodazol führt zur Depolymerisation der Mikrotubuli, welches durch Anfärben von Tubulin überprüft werden kann.

2.7.16 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Für die Behandlung der Zellen mit den unter 2.7.14 beschriebenen Inhibitoren wurden die entsprechenden Zellen zunächst ü./N. verhungert (s. 2.7.13).

Die Inkubation mit den Inhibitoren erfolgte in der vorher ermittelten Konzentration in Verhungerungsmedium für 15 min (AktIV-Inhibitor), 20 min (LY294002; Wortmannin) bzw. 30 min (Nocodazol) bei 37 °C und 7.6 %-iger CO₂-Atmosphäre. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz an Zellen in Verhungerungsmedium parallel mitgeführt, der das Reagenz in gleicher Konzentration enthält, in dem der entsprechende Inhibitor gelöst ist.

Anschließend wurden die Zellen mit PDGF stimuliert (s. 2.7.17), wobei der PDGF-Ansatz wiederholt den verwendeten Inhibitor bzw. die Kontrolle enthielt. Danach wurde wie unter 2.7.17 beschrieben weiter verfahren.

Eingesetzte Konzentration der Inhibitoren:

LY294002:	20 µM
Wortmannin:	100 nM
AktIV-Inhibitor:	2.5 µM
Nocodazol:	2 µg/mL

2.7.17 PDGF-Behandlung der Zellen

Bei PDGF ('Platelet-derived growth factor') handelt es sich um einen Wachstumsfaktor. Durch die Zugabe von PDGF zu verhungerten (s. 2.7.13) eukaryotischen Zellen wird eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten induziert. Hierbei kann es zu einem Verlust von Stressfasern kommen, und es können sowohl periphere als auch zirkuläre (dorsale) 'ruffles' in den Zellen auftreten.

Die in dieser Arbeit verwendete PDGF-BB-Stammlösung lag in einer Konzentration von 10 µg/mL in 4 mM HCl mit 0.1 % BSA vor. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C; für den Gebrauch wurde die Lösung auf Eis aufgetaut.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben ü./N. verhungert (s. 2.7.13). Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 10 ng/mL PDGF in Verhungerungsmedium für 5 min unter zelltypentsprechenden Kulturbedingungen. Als Kontrolle wurde ein Ansatz von Zellen nur mit Verhungerungsmedium parallel mitgeführt.

Nach erfolgter Stimulation der Zellen mit PDGF wurden diese entweder für die Immunfluoreszenz (s. 2.8.2) oder für den GLISA (s. 2.6.4) weiterbearbeitet.

2.7.18 Separation und Anreicherung von fluoreszenz-markierten Zellen mittels Zellsortierers (FACS)

FACS steht für 'Fluorescence activated cell sorting' und beschreibt ein Verfahren, bei dem Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden. Das Vorwärtstreulicht gibt dabei Aufschluss über die Größe der Zellen, das Seitwärtstreulicht hingegen über die Granularität.

Man hat mit dieser Methode des weiteren die Möglichkeit, Zellen zu sortieren und anzureichern, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Das Fluorochrom wird durch Bestrahlung mit dem Laser angeregt und emittiert daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. Über die Lichtemission erhält man ein spezifisches Signal, durch das die Zellen dann separiert werden können.

In dieser Arbeit wurden Zellen mit dem pEGFP Vektor (s. 2.5.1) bzw. mit unterschiedlichen pEGFP Konstrukten (s. Tabelle 2.2), wie oben beschrieben, transfiziert (s. 2.7.10).

Nach etwa 36-48 h wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min) und in 1 mL Wachstumsmedium 4 resuspendiert. Nach dem Sortieren durch Herrn Dr. Lothar Gröbe wurden die Zellen auf Deckgläschen in einer entsprechenden Dichte (2×10^4 Zellen pro well in einer 4 well-Platte) ebenfalls in Wachstumsmedium 4 ausgesät und nach 36-48 h weiter bearbeitet.

Des weiteren erfolgte die Analyse des Makropinozytose-Experiments (s. 2.7.6) mit Hilfe des FACS.

2.8 Immunchemische Methoden

2.8.1 Western Blot

Der Western Blot erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen. Dabei werden die zuvor nach ihrer Größe, mittels SDS-PAGE (s. 2.6.2), aufgetrennten Proteine

elektrophoretisch auf eine feste Matrix transferiert. Der Proteintransfer erfolgt im 'semi-dry'-Verfahren auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran.

Die Membran musste vor dem Transfer in Methanol für 30-60 s aktiviert und anschließend wie das SDS-Gel sowie 2 x 2 Lagen auf Gelgröße zurechtgeschnittenes Whatman-Papier in Blotpuffer äquilibriert werden. Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei wie folgt auf die Kathode geschichtet:

2 Lagen Whatman-Papier

SDS-Gel

Membran

2 Lagen Whatman-Papier als direkter Abschluss zur Anode.

Der Transfer wurde 1.5-2 h bei einer Stromstärke von 120-150 mA durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer erfolgte der Nachweis des zu untersuchenden Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Verwendete Puffer und Antikörper:

Blotpuffer:	Tris-Base	50 mM
	Glycin	39 mM
	SDS	0.037 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
α -Abi1/2, E3B1 (2.11 mg/mL)	Kaninchen polyklonal	1:2000	HZI
α -Abi1, 7B6 (2.38 mg/mL)	Maus monoklonal	1:2000	NYBC
α -Abi1, 4E2 (1.06 mg/mL)	Maus monoklonal	1:1000	NYBC
α -Abi2, P-20 (200 μ g/ml)	Ziege polyklonal IgG	1:2000	Santa Cruz
α -Akt, # 9272	Kaninchen polyklonal	1:2000	Cell Signaling
α - α Tubulin, α 3A2	Maus monoklonal	1:10000	GBF/HZI
α -Cdc42, Klon44	Maus monoklonal IgG ₁	1:250	BD
α -Eps8, 15/Eps8	Maus monoklonal	1:1000	BD
α -Fascin, 55K2 (200 μ g/mL)	Maus monoklonal IgG ₁	1:5000	Santa Cruz
α -Nap1, # 4952 (0.36 mg/mL)	Kaninchen polyklonal	1:1000	GBF/HZI
α -N-WASP, 385-401	Kaninchen polyklonal	1:400	GBF/HZI
α -phospho Akt (Ser473), # 9271	Kaninchen polyklonal	1:2000	Cell Signaling
α -Rac1, Klon23A8 (1 μ g/ μ L)	Maus monoklonal IgG _{2b}	1:2000	Upstate
α -Sra1-B, # 4955 (0.47 mg/mL)	Kaninchen polyklonal	1:5000	GBF/HZI
α -WAVE2, # 1735	Kaninchen polyklonal	1:50000	GBF/HZI
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Firma	
Ziege- α -Maus, Peroxidase gekoppelt (A4a)	1:2000	Dianova	
Ziege- α -Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (B4c)	1:2000	Dianova	
Esel- α -Ziege, Peroxidase gekoppelt (G4c)	1:2000	Dianova	

Tabelle 2.5: Übersicht der für den Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper.

2.8.2 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Nach erfolgtem Transfer der Proteine mittels Western Blot auf die Membran, musste diese zunächst mit 10 % Milchpulver in TBS-T für 30 min bei RT bzw. ü./N. bei 4 °C abgesättigt werden. Darauf folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper in einer geeigneten Verdünnung in 1 % Milch in TBS-T für 60 min bei RT.

Die Membran wurde 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Erstantikörper zu entfernen. Es schloss sich die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper, ebenfalls in einer passenden Verdünnung in 1 % Milch in TBS-T, für 45 min bei RT an. Es erfolgten weitere drei Waschschrte mit TBS-T für jeweils 10 min.

TBS-T:	Tris-Base	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20	0.1 % (v/v)

Bei der Chemolumineszenz handelt es sich um eine chemische Reaktion, bei der Licht emittiert wird. Das Prinzip der Reaktion beruht auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Das dabei emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm sichtbar bzw. an einer speziellen Kamera gemessen.

Das Substrat der Peroxidase (Lumi-Light Western Blotting Substrat, Roche) besteht aus zwei Komponenten, die zu gleichen Teilen frisch miteinander gemischt werden. Es erfolgte eine Inkubation der Membran in der frisch angesetzten Lösung für 2-4 min bei RT. Im folgenden wurde entweder ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach angemessener Belichtungsdauer entwickelt wurde, oder es erfolgte die Entwicklung mittels CCD-('charge-coupled-device')-Kamera.

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Dabei werden bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome, an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Diese Fluorochrome werden mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Es kommt zur Emission längerwelligeren Lichts, d.h. der Farbstoff beginnt zu fluoreszieren, so dass es möglich ist, die räumliche und

zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu bestimmen.

In der Fluoreszenzmikroskopie wird in der Regel eine Quecksilberdampf Lampe verwendet; diese emittiert Licht über das gesamte sichtbare Spektrum sowie ultraviolett. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge wird mit optischen Filtern isoliert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Das emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt. Im Strahlengang befindliche Farbteiler trennen anschließend das Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht und leiten es in das Okular des Mikroskops oder in eine CCD-('charge-coupled-device')-Kamera, in der die verschiedenen Lichtintensitäten Pixel für Pixel durch einen A/D-(Analog/Digital)-Wandler in digitale Graustufen umgesetzt werden. Die so digitalisierten Bilder können dann in einem Computer mit geeigneter Bildverarbeitungssoftware bearbeitet werden.

2.9.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Mikroskop:

Es wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) ausgestattet mit einer 100 W Quecksilberhochdruckdampf Lampe (Carl Zeiss) und einem Filterrad verwendet. Durch Optovarlinen lässt sich die Gesamtvergrößerung um bis zu 2.5-fach erhöhen.

Objektive:

Plan-Apochromat-Immersionsolektive (63 x, 100 x)

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungsindex von 1.518.

Beleuchtung:

Die Regelung der Beleuchtung erfolgte durch elektronisch steuerbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, Visitron Systems). Die Verschlüsse ('shutter') konnten manuell oder Software-unterstützt gesteuert werden.

CCD-Kamera:

Es wurde eine auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte CCD-Kamera (TE/CC D-800PB, CoolSnap K4 oder CoolSnap HQ2, Princeton Scientific Instruments, Princeton, USA) mit Software gesteuerter Kontrolleinheit und Verschluss verwendet.

Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung:

Die Aufnahmekontrolle, die Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildverarbeitung erfolgte entweder mit IPLab Spectrum Scientific Imaging-Software (Scanalytics, USA) an einem Power Macintosh PC 604e oder mit MetaMorph Software (Molecular Devices, Sunnydale, USA). Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit der Adobe Photoshop 7.0.1 Software oder mit ImageJ.

2.9.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mikroskop:

Es wurde das konfokale 'Laser Scanning'-Mikroskop Fluoview1000 von Olympus ausgerüstet mit einem inversen IX81 Mikroskop von Olympus verwendet. Das Mikroskop besitzt eine 100 W Quecksilberdampfampe (Olympus U-RFL-T). Durch Optovarlinen lässt sich die Gesamtvergrößerung bis zu 1.6-fach erhöhen.

Zusätzlich ist das Mikroskop mit einem SIM-Scanner zur gleichzeitigen Photomanipulation wie Photoaktivierung/Bleichen ausgestattet.

Laser:

Das Fluoview1000 ist mit einem Argonlaser (30 mW) für die Anregung bei 457, 488 und 514 nm, einem grünen Festkörper-Laser (10 mW) für die Anregung bei 561 nm und einem roten Helium-Neon-Laser (10 mW) für die Anregung bei 633 nm ausgestattet. Zusätzlich besitzt das Mikroskop einen Festkörper-Laser (20 mW) für die Anregung bei 405 nm.

Objektive:

UPlanSApo 60 x 1.35NA Öl (Olympus)

Plan Apo 100 x 1.45NA Öl TIRFM (Olympus)

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungsindex von 1.518.

Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung:

Die Aufnahme, die Steuerung der Objektive und der Laserlinien, sowie die Kontrolle der konfokalen Lochblende und die Bildverarbeitung erfolgte mit der FV10-ASW 1.4 Software von Olympus auf einem Microsoft Windows Betriebssystem. Die Analyse der Bilder erfolgte mit Hilfe der Metamorph 1.5 Software bzw. mit ImageJ ebenfalls auf einem Microsoft Windows Betriebssystem.

2.9.3 Reinigen der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden in einer HCl/Ethanol-Mischung (40 % konz. HCL/60 % Ethanol p.a.) für 30 min geschüttelt. Danach folgten mehrere Waschschrte mit Wasser (Millipore gereinigt). Des weiteren wurde das Gefäß mit den Deckgläschen und dem Wasser kurz in der Mikrowelle aufgekocht, was die Reinigungswirkung noch erhöht. Danach wurden die Deckgläschen zum Trocknen auf Whatman-Papier vereinzelt und anschließend für den weiteren Gebrauch in einer Glaspetrischale im Autoklav sterilisiert.

2.9.4 Immunfluoreszenzen fixierter Zellen

Man unterscheidet bei Immunfluoreszenzen zwischen direkter und indirekter Fluoreszenz.

Bei der direkten Fluoreszenz werden spezifische fluorchrommarkierte Agenzien oder fluorchrommarkierte Antikörper eingesetzt. Eine der bedeutendsten Beispiele für die direkte Methode ist das Phalloidin; hierbei handelt es sich um das Gift des grünen Knollenblätterpilzes. Phalloidin bindet mit hoher Affinität seitlich an Aktinfilamente und verhindert deren Depolymerisation. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Phalloidin gekoppelt werden, kann F-Aktin in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Bei der indirekten Fluoreszenz erfolgt die Visualisierung der Proteine bzw. Strukturen durch die Bindung eines spezifischen primären Antikörpers, der mit einem fluorchrommarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Da es zu einer Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den Erstantikörper kommt, wird ein

Verstärkungseffekt erzielt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine sehr sensitive Nachweismethode.

Um Aussagen über die Lokalisation von Proteinen bzw. Proteinstrukturen machen zu können, müssen diese zunächst fixiert werden. Dies kann z.B. durch Paraformaldehyd erfolgen, welches Proteinkomponenten untereinander vernetzt. Des weiteren ist es notwendig, dass die Zellen mit Hilfe eines Detergenz permeabilisiert werden, damit Antikörper in die Zellen und die entsprechenden Kompartimente gelangen können.

Die Fixierung der Zellen auf Deckgläschen erfolgte 20 min bei RT mit auf 37 °C vorgewärmtem 4 % Paraformaldehyd (PFA in PBS). Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei RT mit 0.1 % Triton-X100 in 4 % PFA in PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die direkte Fluoreszenz mit Phalloidin bzw. die indirekte Methode mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern.

Dazu wurden im Fall der indirekten Methode zunächst unspezifische Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung abgesättigt. Zum Blocken wurde eine Lösung aus 5 % Pferdeserum in 1 % BSA in PBS verwendet. Darauf folgte die Antikörperinkubation. Dazu wurden 20 µL des primären Antikörpers auf einen Streifen Parafilm getropft, das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf diesen Tropfen gelegt und eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Unter gleichen Bedingungen erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für 45 min bei RT und lichtgeschützt. Nach mehreren Waschschritten in PBS und abschließend in Wasser werden die Präparate auf Objektträgern fixiert. Dazu wurde auf ProLong Gold (Invitrogen) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Deckgläschen wurden dann mit den Zellen nach unten mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig auf das Eindeckmedium gelegt. Die Aushärtung des ProLong Golds erfolgte ü./N. bei RT; die Lagerung der Präparate dann anschließend lichtgeschützt bei 4 °C.

Wurden die Zellen nur mit Phalloidin behandelt, erfolgte diese Behandlung direkt im Anschluss der Permeabilisierung.

Sollte sowohl eine direkte als auch eine indirekte Fluoreszenz durchgeführt werden, wird wie oben in der direkten Methode beschrieben verfahren. Die Inkubation des Phalloidins erfolgte in diesem Fall parallel zum sekundären Antikörper.

In dieser Arbeit für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper und Phalloidine:

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
α-Abi1, 4E2 (1.06 mg/mL)	Maus monoklonal	1:100	NYBC
α-Abi1, 7B6 (2.38 mg/mL)	Maus monoklonal	1:200	NYBC

α -Abi1/2, W8.3	Maus monoklonal	1:20	IEO
α -Akt, # 9272	Kaninchen polyklonal	1:200	Cell Signaling
α - α Tubulin, α 3A2	Maus monoklonal	1:2000	GBF/HZI
α -ArpC5 (p16), # 323H3	Maus monoklonal	unverdünnt	GBF/HZI
α -Cortactin, 289H10	Maus monoklonal	1:2000	GBF/HZI
α -Eps8, 15/Eps8	Maus monoklonal	1:200	BD
α -Fascin, 55K2 (200 μ g/mL)	Maus monoklonal IgG ₁	1:20	Santa Cruz
α -N-WASP, # 145	Maus monoklonal	unverdünnt	GBF/HZI
α -N-WASP, 32F5A3 (1.2 mg/mL)	Maus monoklonal	1:100	GBF/HZI
α -phospho Akt (Ser473), # 9271	Kaninchen polyklonal	1:25	Cell Signaling
α -VASP, # 5500	Kaninchen polyklonal	1:200	GBF/HZI
α -WAVE2/SCAR2	Kaninchen polyklonal	1:500	IEO
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Firma	
Ziege- α -Maus, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 488 (A12c)	1:400	Molecular Probes	
Ziege- α -Maus, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 594 (A13c)	1:200	Molecular Probes	
Ziege- α -Kaninchen, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 488 (B12c)	1:400	Molecular Probes	
Ziege- α -Kaninchen, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 594 (B13c)	1:400	Molecular Probes	
Phalloidin	Verdünnung	Firma	
Phalloidin, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 488 (PH12)	1:200	Molecular Probes	
Phalloidin, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 594 (PH13)	1:200	Molecular Probes	
Phalloidin, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 350 (PH16)	1:50	Molecular Probes	
Phalloidin, gekoppelt mit Alexa Fluor TM 568 (PH17)	1:100	Molecular Probes	

Tabelle 2.6: Übersicht der für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper und Phalloidine.

2.10 Mikroskopie lebender Zellen mit 'live'-PDGF Stimulation

Für die Lebendzellmikroskopie wurde das beheizbare Kammer-System von Warner (Warner Instrument Corp.) verwendet. Nach Einspannen des Deckgläschens (15 mm), mit den ü./N. verhungerten Zellen (s. 2.7.13), in die Kammer, wurde diese sogleich vorsichtig mit Verhungerungsmedium (s. 2.4.1) luftblasenfrei befüllt und auf 37 °C beheizt. Nach Adaptation der Zellen an das veränderte Milieu konnte mit der 'live' Stimulierung der Zellen mit PDGF und der Aufnahme der Videosequenzen begonnen werden. Dazu wurde das anfangs verwendete Medium aus der Kammer mit einer Einmaltransferpipette abgenommen. Die PDGF-Behandlung erfolgte dann wie in Kapitel 2.7.17 beschrieben.

Für die Aufnahme von Videosequenzen mussten folgende Parameter festgelegt werden: Auswahl des Shutter der Phasenkontrast-Beleuchtung, Belichtungsstärke und

–zeit, sowie der Ausschnitt des Bildes, die Zeit zwischen den einzelnen Aufnahmen und die Gesamtdauer des Videos.

2.11 Elektronenmikroskopie

Um die Morphologie der PDGF-induzierten zirkulären Aktinstrukturen auf der dorsalen Oberfläche detaillierter betrachten zu können, wurden Aufnahmen an einem Rasterelektronenmikroskop (REM) angefertigt. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, etwa 24 h später ü./N. für 16-18 h verhungert und anschließend mit PDGF-BB behandelt. Die Stimulationsdauer betrug 3-15 min. Die Fixierung erfolgte durch 2.5 % Glutaraldehyd in DMEM. Die weitere Bearbeitung des Präparats sowie die Aufnahme der REM-Bilder wurde von Herrn Dr. Manfred Rohde durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 PDGF-induzierte Aktinreorganisation

PDGF ('Platelet-derived growth factor') bezeichnet eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die als Mitogene auf Zellen wirken. Die PDGF-Familie besteht aus PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, die von vier verschiedenen Genen kodiert werden und als Monomere inaktiv sind. Die aktiven Dimere treten entweder als Homodimere auf, oder aber im Fall von PDGF-AB als Heterodimer. Ihre Wirkung äußert sich über die Bindung an den PDGF-Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase (RTK), die in zwei verschiedenen Isoformen auftreten kann, als α - oder β -Rezeptor (Kovalenko, Kazlaukas 2003). Die Bindung des aktiven PDGF-Dimers führt zur Dimersierung des Rezeptors, wobei drei mögliche Rezeptorkombinationen auftreten können: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ bzw. $\alpha\beta$ (Heldin et al., 1998).

Interessanterweise wurde ausschließlich für die Stimulierung des PDGF β -Rezeptors mit PDGF-BB eine prominente Reorganisation des Aktinzytoskeletts beschrieben, bei welcher es zu dem Verlust von Stressfasern und zum Auftreten von Lamellipodien und Membran 'ruffles' kommt (Eriksson et al., 1992). Zusätzlich wurde beschrieben, dass auch die Behandlung mit PDGF-AB durch die Stimulation des PDGF α / β -Rezeptors bzw. des PDGF β -Rezeptors in Zellen zu einer Umstrukturierung von Aktin führen kann, die aber sehr viel schwächer ausfällt als im Vergleich zu den von PDGF-BB induzierten Effekten (Arvidsson et al., 1992; Hammacher et al., 1989).

Als einleitendes Experiment zur näheren Charakterisierung von PDGF-induzierter Aktinreorganisation wurden Kontrollfibroblasten (Genotyp Cdc42 fl/del #39) (s. Abschnitt 3.4) mit 10 ng/mL PDGF-BB 5 min stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit serumfreiem DMEM behandelt wurden. Der PDGF-Stimulierung ging eine Verhungerungsphase von 16-18 h voraus; auf diese Weise sollte erreicht werden, dass den Zellen sämtliche Wachstumsfaktoren entzogen werden, die ihnen im serumhaltigen Medium zur Verfügung stehen, und die sie für verschiedene Zellfunktionen, wie den Metabolismus oder die Migration, benötigen; die Zellen sollten also möglichst ruhend vorliegen. In diesem verhungerten Zustand reagieren sie besonders stark auf stimulierende Reize. Zudem zeigt das Zytoskelett von verhungerten Zellen keine besonders prominenten Aktinstrukturen, da deren Erhaltung und Neubildung auf ein Minimum reduziert wird. Werden diese Zellen nun mit einem Wachstumsfaktor wie z.B. PDGF stimuliert, kommt es zu einer deutlichen Änderung der Zellmorphologie (s. Abbildung 3.1).

In Abbildung 3.1 A, A' sind Übersichten von Kontrollzellen mit und ohne PDGF zu sehen und in Abbildung 3.1 B, B' entsprechend vergrößerte Einzelzellen.

Die Abbildung 3.1 A, B zeigt unstimulierte Kontrollfibroblasten. Der Pfeil deutet auf die mittels Phalloidin gefärbten Aktinbündel, sogenannte Stressfasern, hin. Es können auch bereits in unstimulierten Zellen in geringer Frequenz Aktinstrukturen in

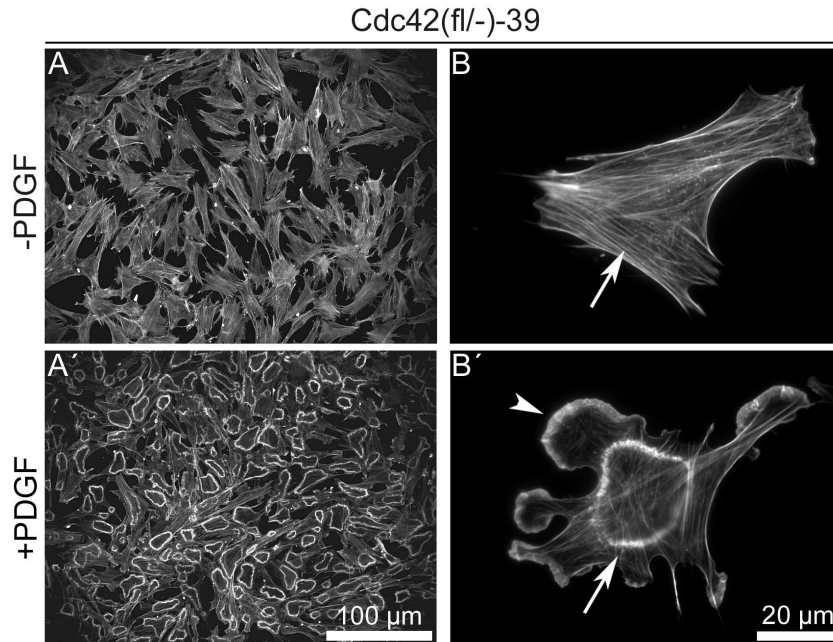


Abbildung 3.1: PDGF-induzierte Aktinreorganisation in Mausfibroblasten.

Dargestellt sind Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) in der Übersicht (A, A') bzw. als Einzelzelle (B, B'). Das Aktinzytoskelett wurde mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, das F-Aktin bindet, gefärbt. (A, B) Unstimulierte Zellen 16-18 h nach Serumentzug. (A', B') Mit PDGF (10 ng/mL, 5 min) stimulierte Fibroblasten nach 16-18 h Verhungierung. PDGF führt zur Bildung prominenter Aktinstrukturen. Der Pfeil in (B) deutet auf Stressfasern. Die Pfeilspitze in (B') weist auf periphere 'ruffles' bzw. Lamellipodien hin; der Pfeil zeigt auf zirkuläres 'ruffling' auf der dorsalen Oberfläche der Zelle.

der Zellperipherie auftreten, sogenannte Membrankräuselungen oder 'ruffles', die allerdings in dieser Abbildung nicht zu erkennen sind.

In Abbildung 3.1 A', B' sind mit PDGF behandelte Zellen zu sehen. Der Pfeil bzw. die Pfeilspitze deuten auf die veränderte Morphologie der Zellen hin. Es sind zum einen ausgeprägte Lamellipodien zu erkennen sowie periphere 'ruffles' (Pfeilspitze); zum anderen ist zu beobachten, dass es zu der Ausbildung von dorsalen zirkulären 'ruffles' (Pfeil) kommt. Es wird deutlich, dass die Stimulierung des PDGF-Rezeptors mit PDGF-BB zur Bildung prominenter Aktinstrukturen führt.

3.2 Die Rolle der PI3-Kinase im PDGF-R Signalweg

Der PDGF-Rezeptor (PDGF-R) gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und besitzt für die Bindung des Liganden eine extrazelluläre Domäne.

Die ligandenbindende Domäne ist über eine einzelne Transmembrandomäne mit dem zytoplasmatischen Teil verbunden, welcher wiederum eine Tyrosinkinasedomäne besitzt, die durch die Bindung von PDGF an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors aktiviert wird (Heldin et al., 1989; Schlessinger, 2000). Durch die Aktivierung werden unter ATP-(Adenosintriphosphat)-Verbrauch Tyrosine, zuerst in der Kinasedomäne des PDGF-Rs selbst (Autophosphorylierung) und dann in Zielproteinen, phosphoryliert (Hunter, 1998b). Mögliche Zielproteine sind Nicht-Rezeptortyrosinkinasen z.B. der Src-Familie, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) wie Sos oder die PI3-Kinase. Phosphorylierte Tyrosine dienen wiederum als Bindestelle für intrazelluläre Signalmoleküle, die SH2-Domänen tragen. Diese Signalmoleküle werden durch die Bindung ebenfalls aktiviert, und es kommt im weiteren zu einer Rekrutierung von Faktoren und somit zur Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden. Eines der Signalmoleküle, das über eine SH2-Domäne in der regulatorischen Untereinheit p85 an den autophosphorylierten PDGF β -Rezeptor bindet und aktiviert wird, ist die sogenannte PI3-Kinase. PI3-Kinasen bilden eine ganze Proteinfamilie mit zwei Untergruppen, Klasse I und Klasse II. Die hier angesprochenen PI3-Kinasen gehören der Klasse I an, die im Säuger vier Gene der katalytischen Untereinheit p110 (α - δ), sowie drei Gene für regulatorische Untereinheiten (p85 α , p85 β und p55 γ) umfasst. Die Aktivierung der PI3-Kinase wiederum führt zur Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe in Phosphatidylinositolphosphaten (Katso et al., 2001; Vanhaesebroeck et al.). Der folgende Text bezieht sich hauptsächlich auf die durch PI3-Kinase-I α -vermittelte Herstellung von Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Hawkins et al., 1992).

Um die Rolle der PI3-Kinase in der Signalkaskade des PDGF-Rs in Bezug auf das Aktinzytoskelett genauer zu untersuchen, wurden Kontrollfibroblasten mit zwei unterschiedlichen Inhibitoren der PI3-Kinase, und zwar LY294002 bzw. Wortmannin, behandelt.

3.2.1 LY294002 inhibiert PDGF-induziertes zirkuläres und verringert peripheres 'ruffling'

LY294002 ist ein spezifischer Inhibitor der Klasse I PI3-Kinasen, bei dem es sich um einen kompetitiven Inhibitor der katalytischen Untereinheit p110 handelt. Die Hemmung

der PI3-Kinase erfolgt reversibel und konzentrationsabhängig. Die benötigte minimale Konzentration an LY294002 zur Inhibierung der PI3-Kinase wurde bereits in den hier verwendeten Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) ermittelt (s. Diplomarbeit K. Schloen). Die Überprüfung der Funktionalität des Inhibitors erfolgte über die Detektion der Aktivierung des Akt (PKB)-Signalwegs (s. Abschnitt 3.3). Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt.

Abbildung 3.2 zeigt, dass vergleichbare Mengen an Akt (Gesamt-Akt) in den verwendeten Zellextrakten vorlagen. Es geht weiter hervor, dass nur in den mit PDGF-stimulierten Kontrollzellen die Phosphorylierung von Akt zu beobachten ist. In unstimulierten Zellen konnte kein phosphoryliertes Akt nachgewiesen werden. Die verwendete LY294002-Konzentration von 20 μ M ist dementsprechend ausreichend, die PI3-Kinase effektiv zu hemmen und wird deshalb in den weiterführenden Experimenten verwendet.

Um zu untersuchen in wiefern sich die Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 auf PDGF-induziertes 'ruffling' auswirkt, wurden die Zellen nach LY294002-Behandlung mit PDGF stimuliert.

Aus der in Abbildung 3.3 (B) gezeigten Quantifizierung geht hervor, dass es durch die Behandlung der Kontrollfibroblasten mit PDGF-BB zur prominenten Reorganisation des Aktinzytoskeletts kommt. Peripheres 'ruffling' tritt in etwa 90 % der Zellen in Erscheinung, die zirkulären Aktinstrukturen etwa in 70 %. Exemplarische Zellen aus dem Quantifizierungsexperiment sind in Abbildung 3.3 (A: A') dargestellt.

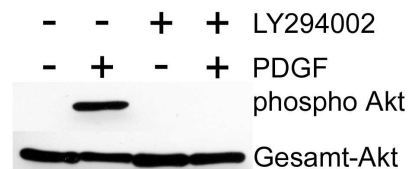


Abbildung 3.2: Inhibierung der PI3-Kinase durch 20 μ M LY294002.

Kontrollfibroblasten (Genotyp Cdc42 fl/-) wurden in einer 6 well-Platte ausgesät und nach ca. 24 h Kultivierung ü./N. (16-18 h) verhungert. Danach wurden die Zellen für 20 min mit 20 μ M LY294002 in DMEM (aus einer 5000 x Stammlösung in DMSO) oder mit mit DMEM + DMSO behandelt. Anschließend erfolgte die PDGF-Stimulierung (10 ng/mL) bzw. die Kontrollbehandlung mit serumfreiem DMEM, wobei die Ansätze weiterhin die vorherige Konzentration an PI3-Kinase-Inhibitor bzw. DMSO enthielten. Zur Herstellung des Extrakts wurden die Zellen in 100 μ L SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Es wurden 25 μ L Probe auf einem SDS-Gel (10 %) getrennt, mit der Western Blot-Technik auf PVDF-Membran transferiert, welche dann mit polyklonalen anti-Akt bzw. anti-phospho-Akt Antikörpern entwickelt wurde.

Die Auswertung der peripheren 'ruffles' nach PDGF-Stimulierung mit vorangegangener LY294002-Behandlung ergab überraschenderweise nur eine schwache Reduktion von ~ 90 % auf 80 % (statistisch nicht signifikant), was mit bereits publizierten Daten

übereinstimmt (Harper et al., 2007). Im Gegensatz dazu führt die Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 zu einem vollständigen Verlust der zirkulären 'ruffles' nach PDGF-Behandlung in diesen Zellen (Cdc42 fl/ -, 39-Zellen) (siehe auch Abbildung 3.3 A: B').

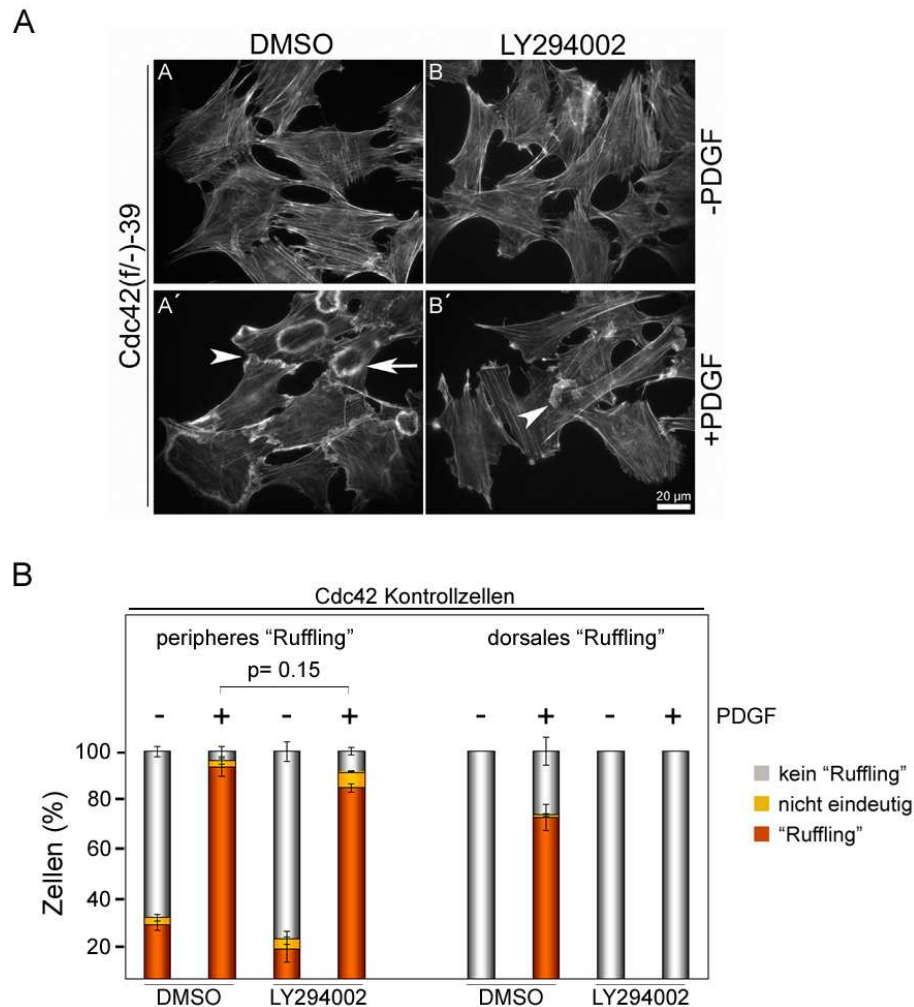


Abbildung 3.3: PI3-Kinase-Inhibition durch LY294002 unterbindet die Bildung zirkulärer 'ruffles' in der PDGF-induzierten Signalkaskade.

Kontrollfibroblasten wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und wie bei Abbildung 3.2 beschrieben mit LY294002 oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. Nach PDGF-Stimulation (10 ng/mL) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin gefärbt (A). (A: A, A') Behandlung der Zellen mit DMSO als Kontrolle; (A: B, B') Behandlung der Zellen mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002; in Ansatz (A: A', B') schloss sich eine PDGF-Stimulation an. Die Pfeilspitzen weisen auf Aktinstrukturen in der Zellperipherie hin; der Pfeil deutet auf zirkuläres 'ruffling', das nur im Kontrollansatz zu beobachten ist. (B) Die Quantifizierung gibt die beobachteten Zellmorphologien (A) nach PDGF-Stimulierung wieder. Die Einstufung der Zellmorphologie erfolgte in drei Klassen: 'ruffling', kein 'ruffling' bzw. nicht eindeutig. Gezeigt sind Mittelwerte in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler; pro Ansatz wurden wenigstens 100 Zellen ausgewertet.

3.2.2 PI3-Kinase-Inhibierung durch LY294002 führt zu reduzierter Rac-Aktivierung

Nachdem in Punkt 3.2.1 beobachtet werden konnte, dass sich die Inhibierung der PI3-Kinase durch 20 μM LY294002 auf die PDGF-induzierte Aktinreorganisation auswirkt, sollte überprüft werden, ob die Inhibierung ebenfalls einen Einfluss auf Signalmoleküle hat, von denen angenommen wird, dass sie sich in der Hierarchie des Signalweges unterhalb der PI3-Kinase befinden, wie z.B. die kleine RhoGTPase Rac.

Wird die PI3-Kinase durch die Stimulierung einer RTK durch den entsprechenden Liganden aktiviert, kommt es, wie bereits in Punkt 3.2 erwähnt, zur Bildung von PIP_3 , welches die Rekrutierung von GEFs an die Membran bewirken kann, was wiederum zu einer Aktivierung der RhoGTPasen, wichtiger Regulatoren des Aktinzytoskeletts, wie z.B. Rac oder Cdc42, führt (Hawkins et al., 1995; Ruusala et al., 1998; Welch et al., 2003; Wennstrom et al., 1994a). Zudem ist bekannt, dass Rac eine wichtige Rolle in Wachstumsfaktor-induziertem Membran 'ruffling' spielt (Vidali et al., 2006).

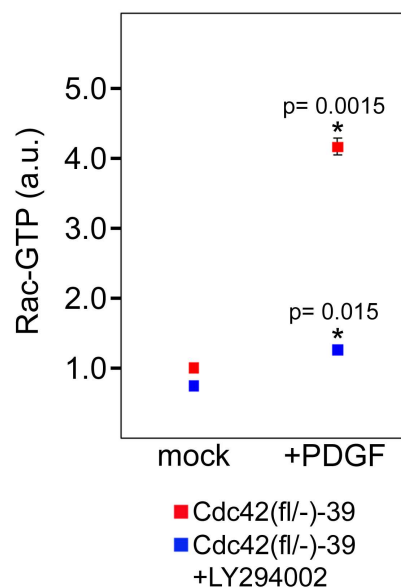


Abbildung 3.4: Reduzierte Rac-Aktivierung nach LY294002.

Kontrollzellen wurden in 10 cm Kulturgefäßen ausgesät und nach 48 h Kultivierung ü./N. verhungert. Anschließend wurde wie in Abbildung 3.2 weiterverfahren. Allerdings wurden die Zellen nach der PDGF-Behandlung (10 ng/mL) entsprechend des GLISA-Protokolls weiterprozessiert. Abbildung 3.4 ist eine graphische Darstellung der Rac-Aktivierung in diesen Zellen nach PI3-Kinase-Inhibition durch LY294002 und nach PDGF-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte der ermittelten Rac-Aktivierung aus wenigstens 3 unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler, wobei der DMSO-Kontrollansatz (mock) auf 1 normalisiert wurde.

Da bereits für den HGF-induzierten Signalweg gezeigt wurde, dass die Rac-Aktivität nach PI3-Kinase-Hemmung reduziert ist (Bosse et al., 2007), sollte überprüft werden, ob dies ebenfalls nach PDGF-Stimulierung der Fall ist.

Rac-Aktivität nach verschiedenen Behandlungen wurde mit Hilfe der GLISA-Methode (s. Abschnitt 2.6.4) überprüft. Dabei wird durch die an eine 96 well-Platte gekoppelte PAK-PBD ('p21-activated kinase'-'p21-binding domain'; GBD: GTPase Binding Domain) aus einem Zellextrakt nur aktiviertes, d.h. GTP-gebundenes Rac bzw. Cdc42 isoliert.

In Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass es in Kontrollfibroblasten nach Stimulation mit PDGF zu einer mehr als vierfachen Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac kommt. Nach PI3-Kinase-Inhibierung durch LY294002 und anschließender PDGF-Behandlung ist die Rac-Aktivität stark reduziert, wobei es dennoch zu einer messbaren und auch signifikanten Aktivierung von Rac um den Faktor 1.7 kommt.

Aus diesen Ergebnissen kann also geschlossen werden, dass ein Großteil der Rac-Aktivierung nach PDGF-Stimulierung über die PI3-Kinase vermittelt wird.

3.2.3 Wortmannin-Behandlung hemmt die Ausbildung von peripheren 'ruffles' und zirkulären Aktinstrukturen

Wortmannin ist ein weiterer Inhibitor der PI3-Kinase, der jedoch in höheren Konzentrationen auch andere Kinasen in ihrer Wirkung beeinträchtigen kann (Cross et al., 1995), damit also weniger spezifisch im Vergleich zu LY294002 ist.

Im Gegensatz zu LY294002 ist Wortmannin kein kompetitiver Inhibitor, sondern hemmt die katalytische Untereinheit p110 irreversibel durch kovalente Bindung an das katalytische Zentrum. Wortmannin wurde in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Diese Konzentration wurde ermittelt, um die Aktivität der PI3-Kinase in den hier verwendeten Kontrollfibroblasten innerhalb von 20 min vollständig zu inhibieren (s. Diplomarbeit K. Schloen).

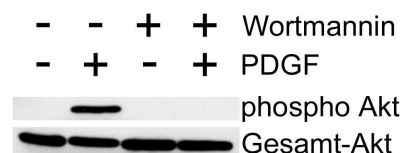


Abbildung 3.5: Inhibition der PI3-Kinase mittels 100 nM Wortmannin.

Mit den Kontrollzellen (Genotyp Cdc42 fl/del) wurde, wie in Abbildung 3.2 beschrieben, verfahren. Anstelle von LY294002 wurden die Zellen mit 100 nM Wortmannin behandelt.

Abbildung 3.5 zeigt, dass es nur in den mit PDGF-behandelten 39-Zellen zu einer Akt-Phosphorylierung kommt. In den verwendeten Zellextrakten lagen vergleichbare

Mengen an Akt (Gesamt-Akt) vor, wie in der Gesamt-Akt-Kontrolle ersichtlich ist. In unstimulierten oder mit Wortmannin behandelten Zellen konnte kein phosphoryliertes Akt detektiert werden.

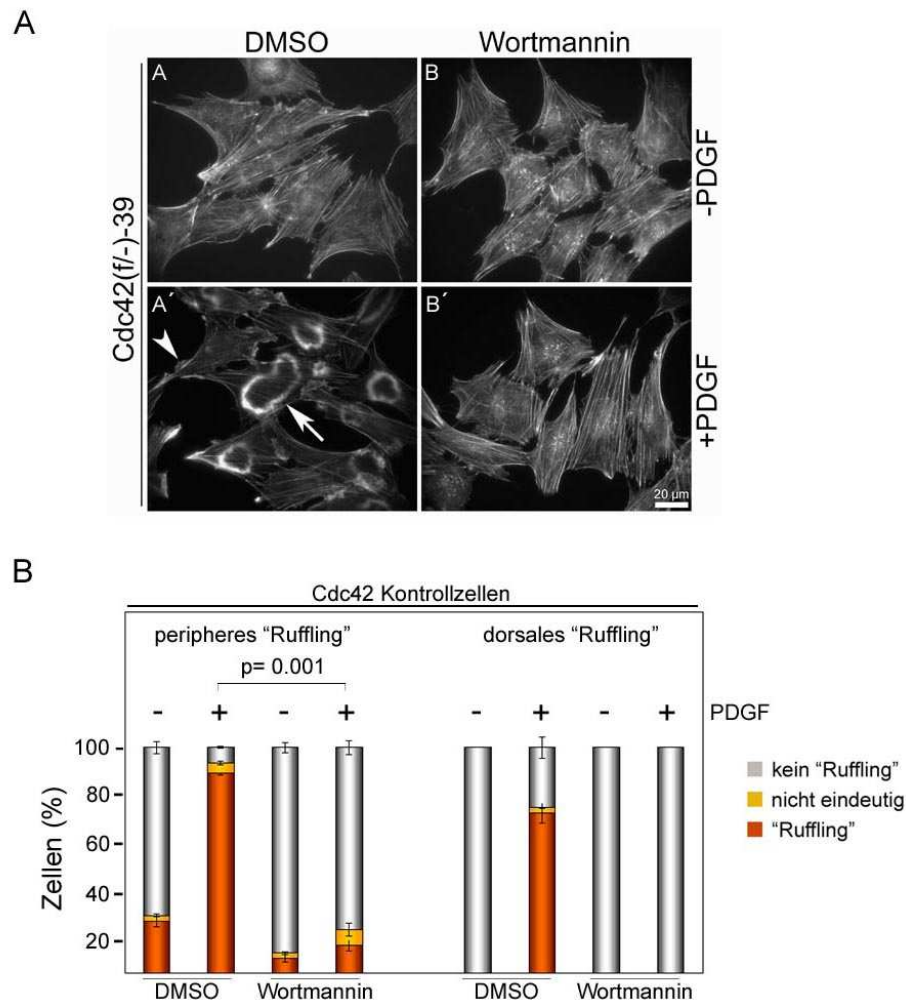


Abbildung 3.6: PI3-Kinase-Inhibition mittels Wortmannin blockiert PDGF-induzierte Membrankräuselungen.

Kontrollzellen wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und wie in Abbildung 3.3 beschrieben weiterverarbeitet. Anstelle von LY294002 wurde in diesem Experiment 100 nM Wortmannin als PI3-Kinase-Inhibitor verwendet. (A: A, A') Kontrollbehandlung der Zellen mit DMSO; (A: B, B') Behandlung der Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin; in Ansatz (A: A', B') schloss sich eine PDGF-Stimulation an. Die Pfeilspitze weist auf periphere 'ruffles' hin; der Pfeil deutet auf zirkuläre Aktinstrukturen, die nur im Kontrollansatz zu beobachten sind. (B) Die Quantifizierung gibt die beobachteten Zellmorphologien (in A) nach PDGF-Stimulierung wieder. Für die Einstufung der Zellmorphologien siehe Abbildung 3.3.

Die eingesetzte Konzentration von 100 nM Wortmannin ist also ausreichend, um eine effektive Hemmung der PI3-Kinase zu bewirken und wird daher in den weiterführenden Experimenten verwendet. Um zu überprüfen ob die Inhibierung der PI3-Kinase durch Wortmannin einen Effekt auf PDGF-induziertes 'ruffling' ausübt, wurden die Zellen nach Behandlung mit Wortmannin mit PDGF stimuliert.

Die Quantifizierung der Zellmorphologien nach Verhungierung und PDGF- und/oder Wortmannin-Behandlung in Abbildung 3.6 (B) zeigt, dass PDGF-BB-Stimulation eine Aktinreorganisation, wie auch schon in Abbildung 3.3 (B) beschrieben, verursacht. Die Stimulierung von peripheren und dorsalen 'ruffles' durch PDGF ist vergleichbar mit denen in Abbildung 3.3 (B), wie exemplarisch Abbildung 3.6 (A: A') dargestellt. Die Inhibierung der PI3-Kinase durch 100 nM Wortmannin führt dazu, dass die Ausbildung zirkulärer 'ruffles' vollständig unterbunden wird, wie auch schon im Fall der LY294002-Behandlung. Im Gegensatz dazu wird peripheres 'ruffling' aber nach Wortmannin-Behandlung ebenfalls stark und signifikant reduziert, was in ähnlichen Experimenten bereits schon gezeigt werden konnte (Wymann and Arcaro, 1994).

3.2.4 PI3-Kinase-Inhibition durch Wortmannin blockiert die Rac-Aktivierung durch PDGF

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde, führt die Stimulierung des PDGF-R durch PDGF-BB zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, infolge dessen es wiederum indirekt zu einer Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac kommt.

Da in Abschnitt 3.2.3 gezeigt werden konnte, dass die PI3-Kinase-Inhibierung durch 100 nM Wortmannin einen Einfluss auf PDGF-induzierte Aktinstrukturen hat, sollte, wie auch schon im Fall der PI3-Kinase-Inhibierung durch LY294002 in Punkt 3.2.2, kontrolliert werden, ob sich die Wortmannin-Behandlung auf die Rac-Aktivität auswirkt.

Die Rac-Aktivierung wurde wie schon oben beschrieben mittels der GLISA-Methode (s. 2.6.4) überprüft.

Die in Abbildung 3.7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit PDGF zu einer starken Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac in den Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) führt (> 4-fach), was den oben beschriebenen Daten (Punkt 3.2.2) entspricht. Im Gegensatz zu LY294002 ist jedoch zu beobachten, dass Wortmannin die durch PDGF-Behandlung induzierte Rac-Aktivierung völlig blockiert.

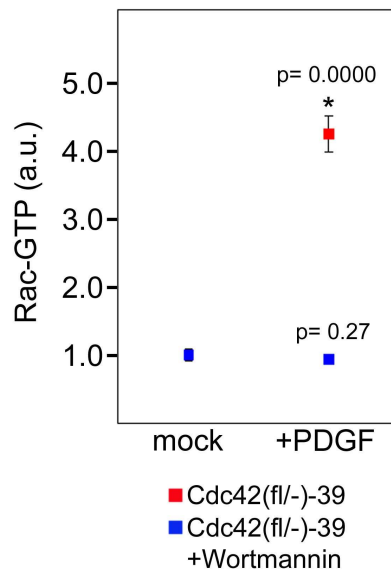


Abbildung 3.7: Blockierte Rac-Aktivierung nach Wortmannin-Behandlung.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden wie in Abbildung 3.4 beschrieben behandelt, jedoch wurde anstelle von LY294002 zur Hemmung der PI3-Kinase Wortmannin in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Dargestellt ist die Rac-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Wortmannin und sich anschließender PDGF-Stimulation. Die Auswertung erfolgte analog zu der in Abbildung 3.4 beschrieben.

3.3 Die Rolle der Akt Kinase (PKB) in der Signalweiterleitung von der PI3-Kinase zur Aktinreorganisation

Bei der Akt Kinase (auch PKB: Proteinkinase B) handelt es sich um eine Serin-/Threoninkinase, die sich im PDGF-Signalweg unterhalb der PI3-Kinase befindet. Wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, führt die Aktivierung der PI3-Kinase z.B. durch die Stimulierung mit PDGF-BB zur Entstehung des sekundären Botenstoffs PIP_3 . Die Akt Kinase bindet über ihre N-terminale PH-Domäne an PIP_3 und wird dadurch an die Zellmembran rekrutiert. Dort wird sie wiederum von anderen Kinasen wie z.B. der PDK1 phosphoryliert (Ser473 und Thr308) und im Zuge dessen aktiviert (Anai et al., 2005; Datta et al., 1999; Franke et al., 1995; Lawlor and Alessi, 2001).

Um die Rolle der Akt Kinase im Signalweg des PDGF-R bzw. der PI3-Kinase und auch in Bezug auf das Aktinzytoskelett näher zu untersuchen, wurde ein Akt-Inhibitor verwendet. Dieser Inhibitor inhibiert Kinasen zwischen der Akt Kinase und der PI3-Kinase (Kau et al., 2003), wobei es sich vermutlich um die PDK1 handelt. Um eine effiziente Hemmung der Akt Kinase zu erreichen, wurden die verwendeten Kontrollfibroblasten (Cdc42 flox/del) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Akt InhibitorIV behandelt. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 2.5 μM für 15 min ausreichend ist, die Aktivierung der Akt Kinase zu unterbinden. Dies konnte

wiederum wie oben beschrieben über die Phosphorylierung des Serins an Position 473 überprüft werden, eine Nachweismethode, die auch im Fall der PI3-Kinase-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin verwendet wurde.

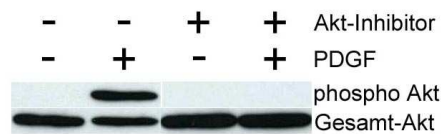


Abbildung 3.8: Inhibierung der Akt Kinase durch 2.5 μ M Akt-Inhibitor.

Kontrollfibroblasten wurden in einer 6 well-Platte ausgesät und nach einer Kultivierung von ca. 24 h ü./N. (16-18 h) verhungert. Im weiteren wurden die Zellen mit 2.5 μ M Akt-Inhibitor (Stammlösung in DMSO) behandelt. Als Kontrolle wurde serumfreies DMEM mit DMSO in der dem Akt-Ansatz entsprechenden Konzentration verwendet. Nach einer Inkubation von 15 min erfolgte die PDGF-Stimulierung (10 ng/mL) bzw. die Kontrollbehandlung mit serumfreiem DMEM, wobei den Ansätzen nochmals die vorherige Konzentration an Akt-Inhibitor bzw. DMSO zugesetzt wurde. Zur Herstellung des Extrakts wurden die Zellen in 100 μ L SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Es wurden 25 μ L Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und wie bei Abbildung 3.2 beschrieben verfahren.

Es wird deutlich, dass es nur im Kontrollansatz nach PDGF-Stimulation zu einer Aktivierung der Akt Kinase kommt. Im Gegensatz dazu konnte weder in unstimulierten Zellen noch in Zellen, die mit dem Akt-Inhibitor behandelt worden sind, phosphoryliertes Akt detektiert werden.

Die verwendete Konzentration von 2.5 μ M Akt-Inhibitor führt also zu einer effektiven Hemmung der Akt Kinase und kann für weitere Experimente zur Klärung des Einflusses der Akt Kinase auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach PDGF-BB-Stimulierung in dieser Konzentration eingesetzt werden.

In Abbildung 3.9 (B) ist die Quantifizierung von Morphologietypen in Kontrollfibroblasten nach Kontroll-und Inhibitorbehandlungen und PDGF-Stimulation dargestellt. Wie auch in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben, kommt es in den PDGF-behandelten Kontrollansätzen zur prominenten Reorganisation des Aktinzytoskeletts (~ 100 % peripheres, ~ 60 % zirkuläres 'ruffling'). In Abbildung 3.9 (A: A') ist eine entsprechende Zelle abgebildet.

Die Hemmung der Akt Kinase durch 2.5 μ M Akt-Inhibitor führt dazu, dass das zirkuläre 'ruffling' vollständig unterbunden wird. Das periphere 'ruffling' ist nach Akt-Inhibierung stark beeinträchtigt, obwohl es noch zu einer Stimulierung von Aktinstrukturen in der Zellperipherie kommt.

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob sich die Inhibierung der Akt Kinase, wie bereits für die Inhibition der PI3-Kinase gezeigt werden konnte, auf die PDGF-induzierte Rac-Aktivität auswirkt. Dazu wurde im folgenden ein Rac-GLISA-Experiment durchgeführt.

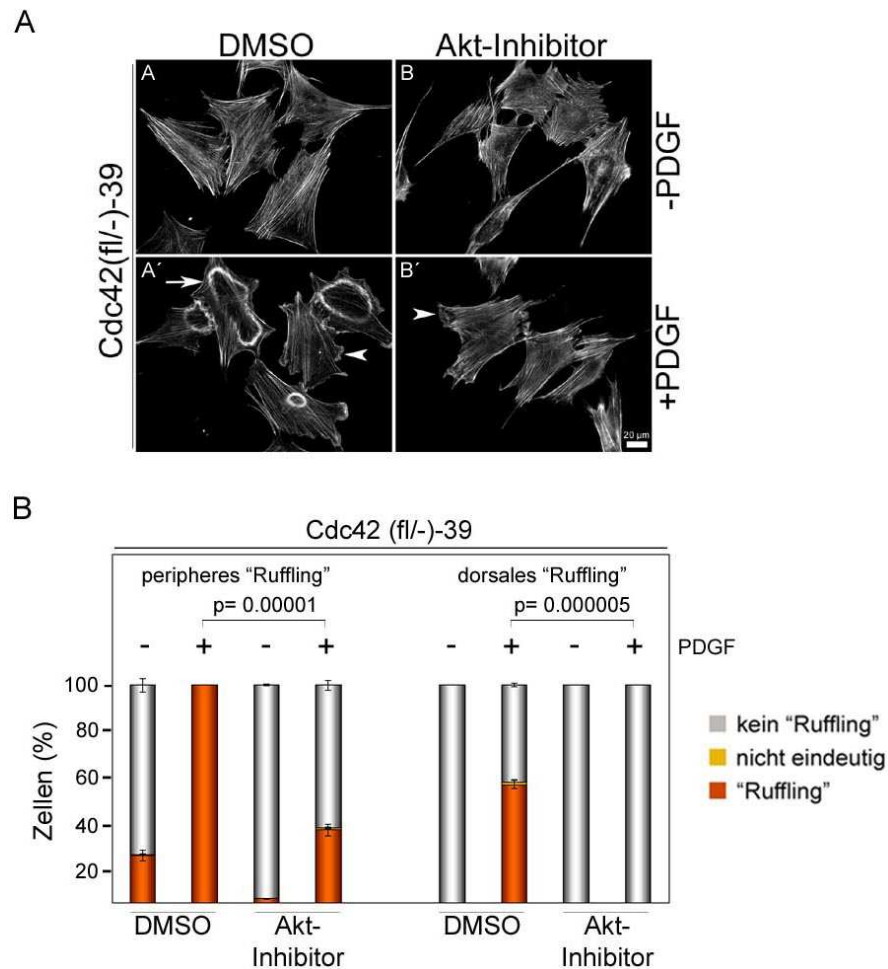


Abbildung 3.9: Blockierung der Bildung zirkulärer ‚Ruffles‘ nach Akt Kinase-Inhibierung.

Kontrollfibroblasten wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und wie bei Abbildung 3.3 beschrieben weiterverarbeitet. Anstelle von LY294002 wurde in diesem Experiment jedoch Akt-Inhibitor für 15 min verwendet. (A: A, A') Behandlung der Zellen mit DMSO als Kontrolle; (A: B, B') Behandlung der Zellen mit dem Akt-Inhibitor und in Ansatz (A: A', B') eine anschließende PDGF-Stimulation. Die Pfeilspitzen weisen auf periphere 'ruffles' hin; der Pfeil deutet auf zirkuläre Aktinstrukturen, die nur im Kontrollansatz zu beobachten sind. (B) Die Quantifizierung gibt die beobachteten Zellmorphologien wieder. Für die Einstufung der einzelnen Zellmorphologien siehe Abbildung 3.3.

Aus Abbildung 3.10 wird ersichtlich, dass die PDGF-Behandlung zu einer Rac-Aktivierung in den Zellen führt, was mit den bereits gezeigten Daten in Punkt 3.2.2 bzw. 3.2.4 übereinstimmt, wobei in diesem Versuchsansatz die Rac-Aktivität nicht so prominent ist (< 2.5-fach). Im Ansatz der Akt-Inhibition und sich anschließender Stimulierung der Zellen mit PDGF ist dagegen zu beobachten, dass es hier zu keiner signifikanten Rac-Aktivierung mehr kommt. Außerdem ist zu beachten, dass der Akt-Inhibitor in den unstimulierten Kontrollen die basale Rac-Aktivität stark vermindert.

Diese Daten erlauben den Rückschluss, dass Rac-Aktivierung in der Signalkaskade des PDGF-R nicht nur PI3-Kinase-Aktivität (und somit PIP₃) benötigt, sondern auch die

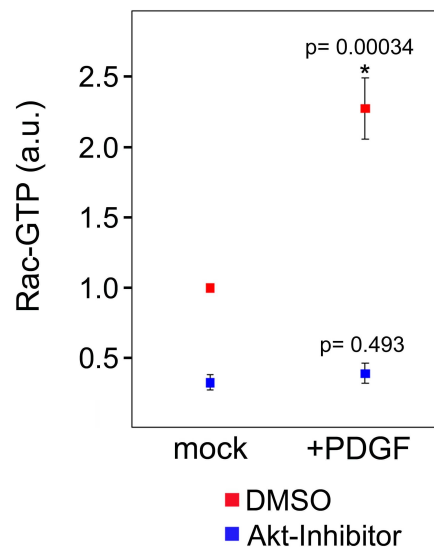


Abbildung 3.10: Rac-Aktivierung ist nach Akt-Inhibition nicht detektierbar.

Mit Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurde wie in Abbildung 3.4 beschrieben verfahren. Anstelle von LY294002 wurde zur Inhibition der Akt Kinase ein AktIV-Inhibitor für 15 min in einer Konzentration von 2.5 μ M eingesetzt.

Dargestellt ist die Rac-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit dem Akt-Inhibitor und sich anschließender PDGF-Stimulation. Die Auswertung erfolgte analog zu der in Abbildung 3.4 beschrieben.

Aktivität der Akt Kinase, was im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten steht, in denen behauptet wird, dass Rac-Aktivierung in T-Lymphozyten und auch in Fibroblasten unabhängig von der Akt Kinase stattfindet und sogar zur Akt-Aktivierung beitragen kann (Genot et al., 2000; Higuchi et al., 2001).

Um die direkte Beteiligung der Akt Kinase an der Ausbildung von Aktinstrukturen weiter zu untersuchen, sollte überprüft werden, ob sie an den Orten der dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts angereichert wird, was z.B. für periphere 'ruffles' bereits beschrieben wurde (Higuchi et al., 2001). Dazu wurden Immunfluoreszenzen (s. 2.9.4) mit polyklonalen Antikörpern gegen Akt bzw. aktives, phosphoryliertes Akt angefertigt. Das Aktinzytoskelett wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Abbildung 3.11 zeigt, dass die Akt Kinase-Färbung gegen Gesamt-Akt als auch gegen phospho-Akt sehr ähnlich aussieht. Daraus kann man schließen, dass die zytoplasmatische Fraktion entweder leicht extrahierbar, oder nach Aktivierung/Rekrutierung vernachlässigbar klein ist, und zelluläres Akt nach der starken Stimulation durch PDGF fast vollständig in 'ruffles' rekrutiert wird.

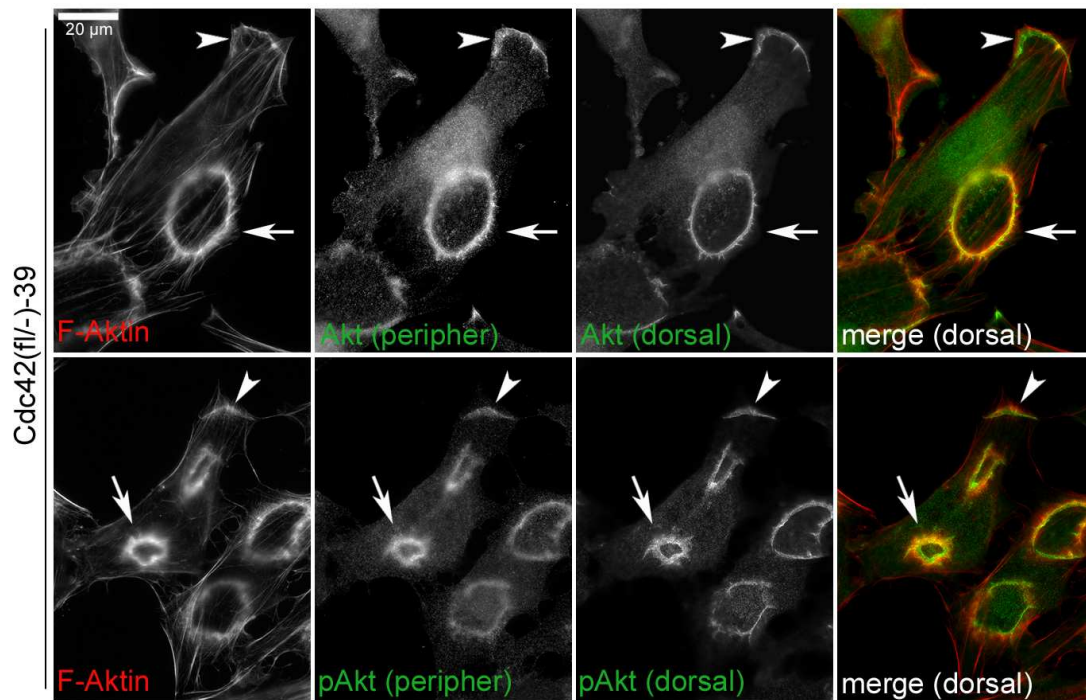


Abbildung 3.11: Lokalisation der Akt Kinase in Cdc42(f/-)-Kontrollzellen.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für etwa 24 h kultiviert, gefolgt von Verhungerung ü./N. (16-18 h) und PDGF-Stimulierung (10 ng/mL). Die Immunfluoreszenz mit den polyklonalen α -Akt bzw. α -phosphoAkt Antikörpern zur Darstellung der subzellulären Lokalisation der Akt Kinase im ruhenden und aktiviertem Zustand bzw. mit Phalloidin zur Darstellung von Aktinstrukturen erfolgt wie unter 2.9.4 beschrieben. Gezeigt ist die Akt-Färbung im peripheren und dorsalen Fokus der Zelle. Die Pfeilspitzen deuten auf Aktinstrukturen in der Zellperipherie, die Pfeile auf zirkuläre 'ruffles' auf der dorsalen Oberfläche der Zelle.

Mit den Immunfluoreszenzen aus Abbildung 3.11 konnte gezeigt werden, dass die Akt Kinase in PDGF-induzierten Aktinstrukturen lokalisiert.

3.4 Die Rolle der kleinen RhoGTPase Cdc42 in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation

In Abschnitt 3.2.2 wurde bereits beschrieben, dass es im Zuge der Aktivierung des PDGF-R zu der Rekrutierung von GEFs an die Zellmembran kommen kann und dies wiederum zu der Aktivierung der kleinen RhoGTPasen, u.a. von Rac und Cdc42, führt. RhoGTPasen sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie an Rezeptoren, wie z.B. dem PDGF-Rezeptor, eingehende Signale zu den entsprechenden Effektoren weiterleiten. Sie sind an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge wie dem Umbau des Aktinzytoskeletts, der Migration und dem Vesikeltransport beteiligt (Jaffe and Hall, 2005).

Die Beteiligung der GTPase Rac wurde weiter oben im Zusammenhang mit der PI3-Kinase und Akt (s. Kapitel 3.2 und 3.3) schon berücksichtigt, woraus sich ergab, dass

es tatsächlich zu einer starken Aktivierung nach PDGF-Stimulierung kommt. Weiter unten wird die Beteiligung von Rac und seinen Effektoren noch genauer betrachtet (s. Kapitel 3.6 und 3.7). Um eine mögliche Rolle von Cdc42 zu bestimmen, sollte hier zunächst geklärt werden, ob Cdc42 nach PDGF-BB-Stimulierung überhaupt signifikant aktiviert wird. Dazu wurden Cdc42-Aktivierungsexperimente mit dem Cdc42-GLISA durchgeführt. Die Methode ist analog zu der bereits in Abschnitt 2.6.4 und 3.2.2 besprochenen Bestimmung der Rac-Aktivität. In Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) kann beobachtet werden, dass es tatsächlich zu einer Aktivierung der kleinen RhoGTPase Cdc42 durch die Behandlung mit PDGF in den Kontrollzellen kommt. Die durch PDGF vermittelte Cdc42-Aktivierung ist zwar nicht so ausgeprägt wie die von Rac, aber signifikant messbar im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

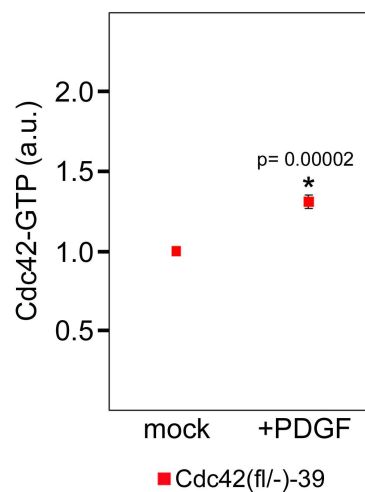


Abbildung 3.12: PDGF-Stimulierung aktiviert die kleine RhoGTPase Cdc42.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden in 10 cm Kulturgefäßen ausgesät und nach 48 h Kultivierung ü./N. verhungert. Im Anschluss erfolgte die Stimulierung mit PDGF-BB (10 ng/mL) für 5 min, und die Weiterprozessierung entsprechend des GLISA-Protokolls. Die graphische Darstellung zeigt die Cdc42-Aktivierung in Kontrollfibroblasten nach PDGF-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte der ermittelten Cdc42-Aktivierung aus wenigstens 3 unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler, wobei der Kontrollansatz (mock) auf 1 normalisiert wurde.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden durch zweifache homologe Rekombination so modifiziert, dass sie ein mit synthetischen loxP-Sequenzen flankiertes Cdc42-Gen besitzen. In diesen sogenannten getargeteten Zellen wurde eines dieser Allele deletiert, so dass erst ein Null-Allel entstand. Diese Zellen wurden wiederum zu Fibroblasten differenziert und mit dem 'large T-antigen' des SV40 Virus immortalisiert, woraus die Fibroblastenlinie #39 hervorging. Alle bisher und weiterhin beschriebenen Versuche mit Kontrollfibroblasten beziehen sich auf diese Zellen mit dem Genotyp Cdc42(fl/-). Aus diesen Cdc42(fl/-)-Zellen (39) wurden wiederum zwei unabhängige Cdc42(-/-)-Zelllinien (397; 399) etabliert (freundlicherweise zur Verfügung

gestellt von Dr. Cord Brakebusch, Universität Kopenhagen). Die genaue Prozedur ist beschrieben (Czuchra et al., 2005) und eine erste Charakterisierung der Zellen wurde vorgenommen (Bosse et al., 2007). Mithilfe dieser Zellen sollte die Rolle der kleinen GTPase Cdc42 für PDGF-induzierte Aktinreorganisation charakterisiert werden.

Um zu untersuchen, ob das Fehlen von Cdc42 in Fibroblasten einen Einfluss auf die durch PDGF ausgelöste Signalkaskade und die daraus resultierende Reorganisation des Aktinzytoskeletts hat, wurden Cdc42(fl/-)-Zellen und Cdc42(-/-)-Zellen mit 10 ng/mL PDGF für 5 min stimuliert. Als Kontrolle dienten Kontroll- und 'knockout'-Zellen, die jeweils nur mit serumfreiem DMEM behandelt wurden. Allen Behandlungen ging eine Verhungerungsphase von 16-18 h voraus. Die beiden unabhängigen Cdc42-'knockout'-Klone, 397 bzw. 399, wurden in den Experimenten parallel behandelt. Die Ergebnisse waren sehr ähnlich und wurden daher in der Endauswertung zusammengefasst und sind als Cdc42-KO (397/399) dargestellt.

Es fällt auf, dass das periphere 'ruffling' nach PDGF-Stimulation durch das Fehlen von Cdc42 nicht beeinträchtigt ist (s. Abbildung 3.13), was zu früheren Resultaten passt, die beschreiben, dass diese Zellen keinen lamellipodialen Defekt aufweisen (Czuchra et al., 2005). Es scheint eher, dass die Cdc42-KO-Zellen ein leicht verstärktes peripheres 'ruffling' zeigen als die Kontrollzellen, was in Abbildung 3.13 zu erkennen ist. Ein anderes Bild zeigt sich dagegen, bei der Betrachtung der zirkulären Aktinstrukturen, die in unstimulierten Zellen vollständig fehlen. Werden die Zellen mit PDGF stimuliert, ist zu beobachten, dass in mehr als 70 % der Cdc42(fl/-)-Zellen solch

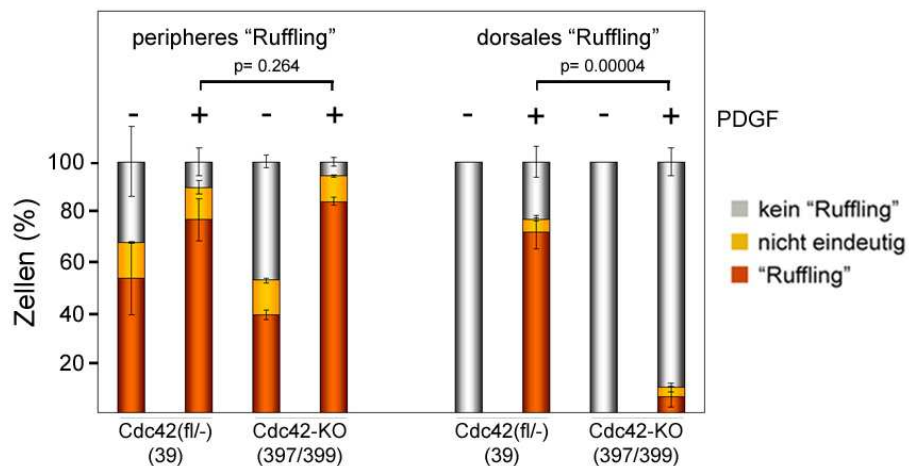


Abbildung 3.13: Starke Reduzierung zirkulärer 'ruffles' in Cdc42-KO-Zellen.

Die Cdc42(fl/-)-39 bzw. Cdc42(-/-)-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, nach etwa 24 h Kultivierung ü./N. für 16-18 h verhungert und anschließend mit PDGF (10 ng/mL) stimuliert oder als Kontrolle mit serumfreiem DMEM behandelt. Die Quantifizierung und Einstufung der verschiedenen Zellmorphologien nach Phalloidininfärbung erfolgte wie in Abbildung 3.3 bereits beschrieben.

zirkuläre Aktinformen auftreten, wohingegen die Ausbildung in den Cdc42(-/-)-Zellen stark reduziert ist auf weniger als 10 % (s. Abbildung 3.13).

Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit einer früheren Publikation, in welcher Zellen aus einem konventionellen Cdc42 'knockout' verwendet wurden (Yang et al., 2006).

Zirkuläres 'ruffling' wird oft in den Zusammenhang mit einem endozytischen Prozess der Makropinozytose gebracht (s. 2.7.6), wobei entweder kontinuierlich oder Wachstumsfaktor-induziert größere plasmamembranumschlossene Flüssigkeitsmengen von der Zelle aufgenommen werden, was zur Bildung großer Vakuolen bzw. Makropinosomen führt (Dowrick et al., 1993). Auch über periphere Lamellipodienaktivität kann Makropinozytose vermittelt werden, aber das Volumen, das über zirkuläres 'ruffling' aus der Umgebung aufgenommen wird, ist größer (Marsh, 2001).

Um zu untersuchen ob Cdc42(-/-)-Zellen in ihrer Fähigkeit Makropinosomen zu bilden, und somit Flüssigkeit aus der Umgebung aufzunehmen, beeinträchtigt sind, wurde Medium mit fluoreszenzmarkiertem FITC-Dextran zum Nachweis verwendet. Dazu wurden Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) und Cdc42-KO-Zellen nach einem Serumentzug für 16-18 h mit oder ohne PDGF-BB und mit oder ohne FITC-Dextran für etwa 20 min stimuliert. Die Aufnahme des fluoreszenten Mediums wurde direkt am FACS (s. 2.7.18) über die Intensität der Fluoreszenz, die proportional zur aufgenommenen Flüssigkeitsmenge ist, vorgenommen. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

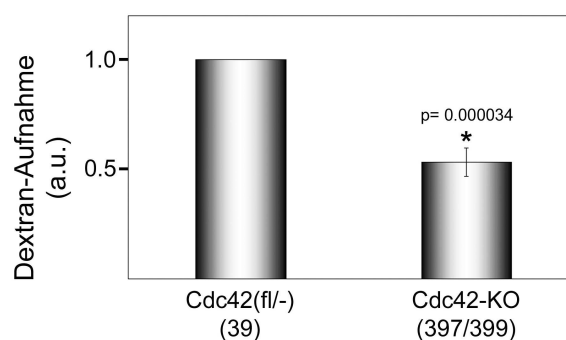


Abbildung 3.14: Verringerte Makropinozytoserate in Cdc42-KO-Zellen.

Cdc42(fl/-) und Cdc42(-/-)-Zellen wurden in einer 6 well-Platte ausgesät, 24 h weiter kultiviert und ü./N. verhungert. Die Zellen wurden dann mit PDGF-BB (10 ng/mL) für etwa 20 min stimuliert oder als Kontrolle mit serumfreien DMEM behandelt; alle Ansätze enthielten zusätzlich fluoreszenzmarkiertes Dextran (0.5 mg/mL) (s. auch 2.7.6). Die Analyse des Experiments erfolgte am FACS. Der Graph zeigt Mittelwerte der ermittelten Dextranaufnahme aus drei unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler, wobei der für die Kontrollfibroblasten ermittelte Wert auf 1

Abbildung 3.14 zeigt, dass die Cdc42-KO-Zellen in ihrer Fähigkeit FITC-Dextran-haltiges Medium aufzunehmen um > 40 % reduziert sind. Die Makropinozytoserate wird also von Cdc42 signifikant mit beeinflusst.

3.5 N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42

N-WASP ist ein Mitglied der WASP/WAVE-Proteinfamilie, für die bekannt ist, dass sie Signale von kleinen RhoGTPasen wie Cdc42 und Rac an den Arp2/3-Komplex, einen Aktinnukleator, weiterleiten, der daraufhin aktiviert wird und somit zur Aktinpolymerisation führt (Stradal et al., 2004). Mitglieder der WASP/WAVE-Familie zählen zu den prominentesten und potentesten Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes (Disanza et al., 2005; Higgs and Pollard, 2001), wobei die Aktivierung von N-WASP durch Cdc42, und die Regulation des WAVE-Komplexes hingegen über die kleine RhoGTPase Rac vermittelt wird.

Da in Abschnitt 3.4 gezeigt werden konnte, dass Cdc42 eine entscheidende Rolle in der PDGF-induzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Bezug auf zirkuläres Membran 'ruffling' spielt, sollte nun untersucht werden, ob N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42 ebenfalls in diese Signalkaskade involviert ist.

3.5.1 Untersuchung von PDGF-induzierter Aktinreorganisation in N-WASP-'knockout' Zelllinien

Um zu überprüfen ob N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42 einen Einfluss auf PDGF-induzierte Aktinstrukturen hat, wurde die PDGF-Zellantwort in N-WASP-defizienten Zelllinien untersucht. Dazu wurden Zellen aus zwei verschiedenen N-WASP-'knockouts' verwendet (Lommel et al., 2001; Snapper et al., 2001). Bei diesen unabhängig voneinander etablierten Zelllinienpaaren (jeweils Kontrolle und 'knockout') handelt es sich zum einen um die als Klon1 N-WASP(fl/fl) und 1H51 N-WASP(-/-) und zum anderen um die als R2 N-WASP(wt/wt) und R6 N-WASP(-/-) bezeichneten Zellen.

Es sollte also untersucht werden, in welchem Ausmaß N-WASP(-/-)-Zellen in der Lage sind nach PDGF-Stimulierung zirkuläre 'ruffles' auszubilden. Dazu wurden die unterschiedlichen N-WASP-Zellen nach einer Verhungerungsphase von 24 h mit PDGF stimuliert. Die Resultate sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Es wird deutlich, dass weder das PDGF-induzierte 'ruffling' in der Zellperipherie noch das dorsale zirkuläre 'ruffling' in den N-WASP-'knockout'-Zellen beeinträchtigt ist (s. A, B). Weder in der

1H51-Zelllinie (Abbildung 3.15 A) noch in R6-Zellen (Abbildung 3.15 B) kommt es zu einer signifikanten Reduzierung zirkulärer Aktinstrukturen nach PDGF-Behandlung.

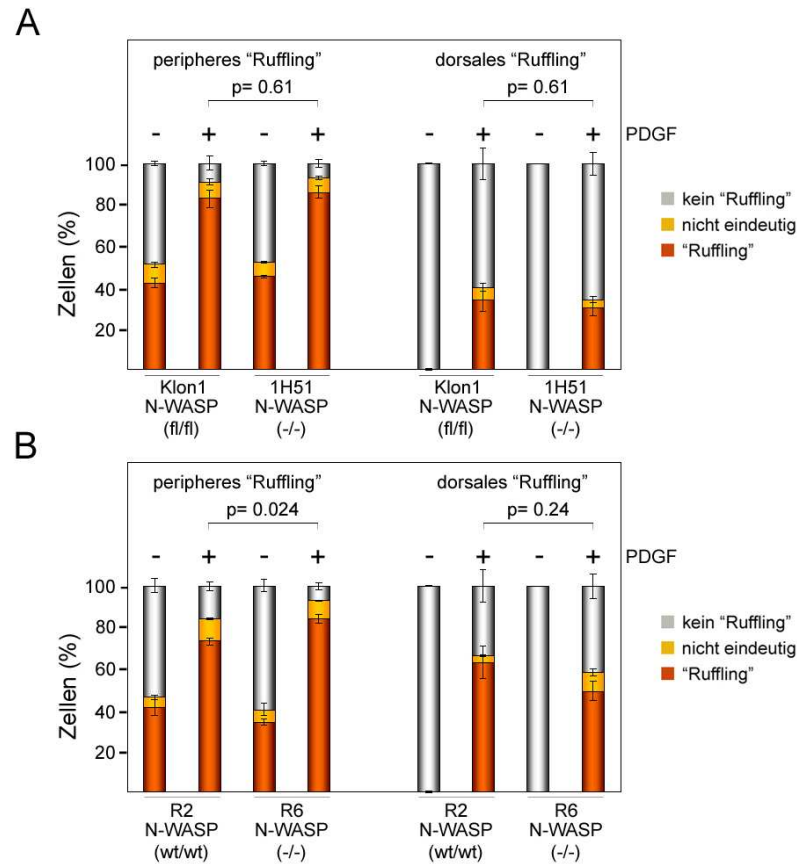


Abbildung 3.15: Die Bildung zirkulärer Aktinstrukturen ist N-WASP unabhängig.

Mit den N-WASP-Zellen wurde wie in Abbildung 3.13 beschrieben verfahren; die Verhungierungszeit bei diesen Zelllinien betrug jedoch 24 h. Die Quantifizierung und Auswertung erfolgte analog wie bereits in Abbildung 3.3 beschrieben. (A) Es wurden N-WASP(fl/fl)-Zellen (Klon1) und N-WASP(-/-)-Zellen (1H51), und (B) N-WASP(wt/wt)-Zellen (R2) und N-WASP(-/-)-Zellen (R6) verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die verwendeten N-WASP-Zellen nur geringfügige Schwankungen aufweisen betreffend ihrer Fähigkeit periphere bzw. dorsale 'ruffles' ausbilden zu können. Dies steht im Widerspruch zu bereits publizierten Daten, die besagen, dass zirkuläres 'ruffling' bezüglich seiner Ausprägung und der Makropinozytoseleistung stark gehemmt ist in N-WASP defizienten Zellen (Legg et al., 2007).

3.5.2 N-WASP-‘knockdown’ hat keinen Einfluss auf zirkuläres ‘ruffling’

Zusätzlich zu der Verwendung der N-WASP-KO-Zellen sollte eine mögliche Funktion von N-WASP in der PDGF-induzierten Signalkaskade mit Hilfe der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) untersucht werden. Dieser Mechanismus der Genregulation ist oben beschrieben (s. Abschnitt 2.7.11). Die Komplementarität dieser Methoden ist nicht zuletzt im völlig anderen Zeitrahmen begründet: während die klassische Gendeletion ein langer Prozess ist, bei welchem die Zellen viele Teilungen durchlaufen (entweder im Organismus oder *in vitro*) und dabei Zeit haben mögliche Defizienzen durch das Einschalten alternativer Signalwege zu kompensieren, so unterdrückt die RNA-Interferenz innerhalb von Stunden nach der Transfektion die Bildung der entsprechenden RNA. Das Protein verschwindet dann infolge des für dieses Proteins typischen Umsatzes innerhalb wenigen (1-5) Tagen aus der Zelle. Die Zellen haben in der Regel keine Zeit um den Verlust zu kompensieren. Auf der anderen Seite ist RNAi im Gegensatz zum klassischen ‘knockout’ aber auch durchlässig, so dass typischerweise ein Rest Genexpression (individuell 1-25 %) verbleibt. Beide Methoden, ‘knockout’ und ‘knockdown’, haben also ihre spezifischen Eigenheiten und die Anwendung beider Methoden vertieft das Verständnis der Rolle des jeweiligen Gens. Die RNA-Interferenz wurde in dieser Arbeit durch die Transfektion einer für N-WASP spezifischen shRNA vermittelt. Dazu wurden Kontrollfibroblasten (Genotyp Cdc42 fl/-) mit der N-WASP shRNA oder mit einem Kontrollplasmid (mock) transfiziert (s. 2.7.10)

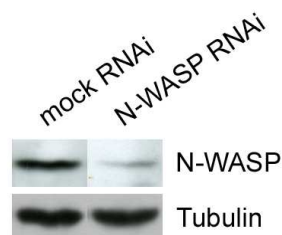


Abbildung 3.16: Effizienter N-WASP-‘knockdown’ 72 h nach Transfektion.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) wurden ausgesät und am folgenden Tag entweder mit der N-WASP- bzw. Kontroll-shRNA transfiziert. 2-5 Tage nach Transfektion wurden Zellextrakte genommen und mittels Western Blot der Zeitpunkt ermittelt, an dem N-WASP am stärksten herunterreguliert ist. Tubulin diente als Ladekontrolle.

und mit Hilfe von Western Blots an den Tagen 2-5 nach Transfektion ermittelt, dass der transiente ‘knockdown’ von N-WASP 72 h nach Transfektion am effizientesten ist (s. Abbildung 3.16). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob der N-WASP-‘knockdown’ keinen Phänotyp bezüglich der PDGF-induzierten Reorganisation des Aktinzytoskelett aufweist, ähnlich wie in N-WASP-KO-Zelllinien beobachtet.

In Abbildung 3.17 (A), die exemplarische Aufnahmen von Zellmorphologien zeigt, kann beobachtet werden, dass die PDGF-Behandlung im Kontrollansatz (A: A') zu einer prominenten Umstrukturierung von Aktinfilamenten führt. Aus der Quantifizierung in Abbildung 3.17 (B) wird ersichtlich, dass zu mehr als 90 % peripheres und zu etwa 60 % zirkuläres 'ruffling' induziert wird. Diese Werte sind vergleichbar mit bereits

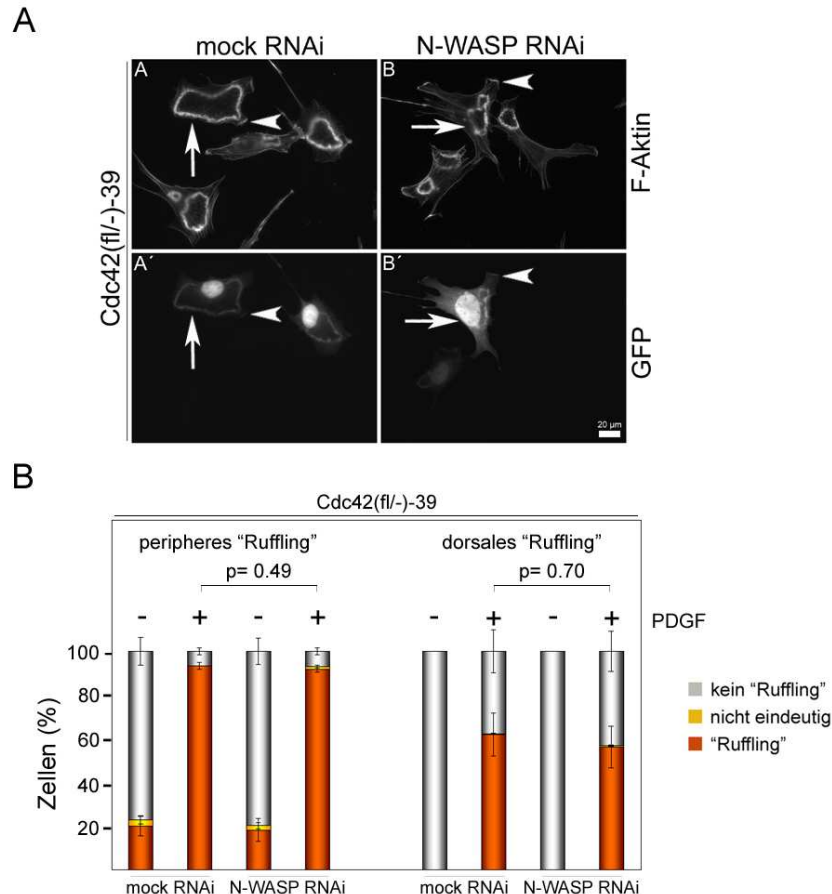


Abbildung 3.17: N-WASP-'knockdown' hat keinen Einfluss auf PDGF-induzierte Membran 'ruffles'.

In Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) sollte mittels Transfektion einer N-WASP spezifischen shRNA, die zur transienten Verminderung des Proteins N-WASP führt, überprüft werden, inwiefern die Unterdrückung der N-WASP-Expression einen Einfluss auf die PDGF-vermittelte Aktinreorganisation hat. Als Kontrolle wurde ein Kontrollplasmid (mock RNAi) verwendet. In beiden Fällen kodiert das Plasmid ebenfalls für das grün fluoreszierende Protein (GFP). (A) Exemplarische Darstellung von Zellmorphologien. Pfeilspitzen deuten auf periphere, Pfeile auf dorsale 'ruffles'. (B) Die Quantifizierung erfolgte wie bereits in Abbildung 3.3 beschrieben.

beschriebenen Daten aus Abschnitt 3.2.1 bzw. 3.2.3. Die Sicherheit, dass die ausgewerteten Zellen auch tatsächlich shRNA exprimieren und somit keine stabile N-WASP-RNA, ergibt sich aus dem Design des verwendeten shRNA-Vektors, welcher simultan GFP-Expression induziert. Der Vektor erlaubt also eine Einzelzellanalyse von betroffenen Zellen. Die Herunterregulation von N-WASP in Kontrollfibroblasten hat keine signifikanten Auswirkungen auf PDGF-induzierte Aktinstrukturen weder in der

Zellperipherie noch auf der dorsalen Oberfläche der Zelle, was ebenfalls in den Aufnahmen der Zellen sichtbar ist in Abbildung 3.17 (A: B').

Aus der Quantifizierung geht also hervor (s. Abbildung 3.17 B), dass beide Formen des 'rufflings' nur schwach reduziert sind, was übereinstimmt mit den, in den N-WASP-KO-Zellen, bereits ermittelten Daten (s. Abschnitt 3.5.1).

3.5.3 N-WASP lokalisiert nicht in PDGF-induzierten Membran 'ruffles'

Nachdem bereits in den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 gezeigt werden konnte, dass N-WASP nicht in die PDGF-R induzierte Signalkaskade involviert ist, die zu Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts führt, sollte im weiteren die subzelluläre Lokalisation von N-WASP überprüft werden.

Dazu wurden zum einen Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) mit GFP-N-WASP oder GFP allein als Kontrolle transfiziert (s. 2.7.10); zum anderen wurden Immunfluoreszenzen fixierter Zellen angefertigt. Verwendet wurden verschiedene monoklonale Antikörper, die sich

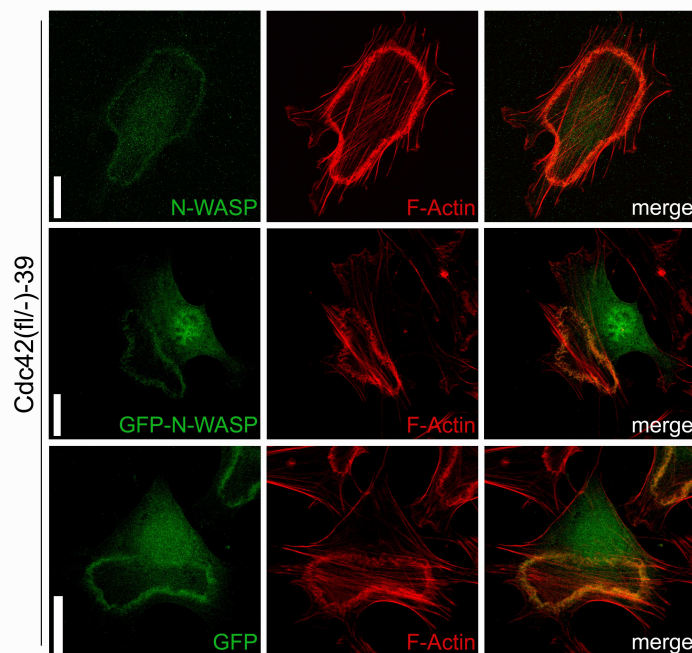


Abbildung 3.18: N-WASP lokalisiert nicht in PDGF-induzierten Aktinstrukturen.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden entweder transfiziert mit GFP-N-WASP bzw. dem GFP-Leervektor, oder es erfolgte eine Immunfluoreszenz, in der spezifische monoklonale Antikörper gegen endogenes N-WASP verwendet wurden. Des Weiteren wurden die Zellen mit Phalloidin behandelt um Aktinfilamente zu färben. Gezeigt sind sowohl die Einzelaufnahmen als auch die übereinander gelegten Bilder (merge). Der Maßstab entspricht 20 µm.

spezifisch gegen N-WASP richten. Das Aktinzytoskelett wurde in beiden Fällen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte in diesem Fall an dem Konfokalen 'Laser Scanning'-Mikroskop (KLSM).

Es ist zu erkennen, dass es zu keiner spezifischen Lokalisation von N-WASP kommt, weder in der Antikörperfärbung von N-WASP, noch im Fall des durch Transfektion ektopisch exprimierten GFP-markierten Proteins (s. Abbildung 3.18). Es fällt auf, dass ein großer Teil des Proteins zytoplasmatisch lokalisiert ist. Zudem ähnelt die Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins stark der Lokalisation, die man beobachtet, wenn Zellen mit dem GFP-Leervektor allein transfiziert wurden. Dies ist sowohl in den Einzelaufnahmen als auch in den übereinander gelegten Bildern (merge) zu erkennen. Die prinzipielle Funktionalität der verwendeten Antikörper und GFP-Konstrukte ist in anderen Arbeiten hinlänglich beschrieben worden (Lommel et al., 2004; Lommel et al., 2001; Weiss et al., 2009).

3.5.4 PDGF-induzierte Makropinosomenbildung ist unabhängig von N-WASP

Wie zuvor in Abschnitt 3.4 beschrieben steht das durch Wachstumsfaktoren induzierte dorsale 'ruffling' in Zusammenhang mit dem endozytischen Prozess der Makropinozytose. Schließen sich die zirkulären Aktinstrukturen kommt es in den meisten Fällen zur Bildung von Makropinosomen (Dowrick et al., 1993), große mit Flüssigkeit gefüllte Vesikel oder Vakuolen, die lichtmikroskopisch zu beobachten sind. Da bereits in den Abschnitten 3.5.1-3.5.3 gezeigt werden konnte, dass N-WASP weder für die Ausbildung von PDGF-induzierten Membrankräuselungen in der Zellperipherie noch auf der dorsalen Oberfläche der Zelle benötigt wird, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob N-WASP eine mögliche Rolle bei dem Prozess des Schließens der zirkulären 'ruffles' bzw. bei der Bildung von Makropinosomen eine Rolle spielt.

Dazu wurden Videosequenzen von lebenden N-WASP-defizienten Zellen (1H51), und entsprechenden Kontrollzellen, (fl/fl)-Zellen (Klon1), die direkt am Mikroskop mit PDGF stimuliert wurden, angefertigt (s. 2.10).

Einzelne Aufnahmen dieser Videosquenzen sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Es wird deutlich, dass es in beiden Zelllinien, sowohl in N-WASP-Kontroll- als auch in N-WASP-'knockout'-Zellen, 3-4 min nach der Stimulierung mit PDGF-BB, zur Ausbildung zirkulärer 'ruffles' kommt (Pfeile). In den N-WASP-KO-Zellen kommt es in einer Zelle zur Bildung von zwei dorsalen 'ruffles'. Im weiteren Verlauf der Sequenz ist zu

erkennen, dass sich ebenfalls in beiden Zelllinien große Vesikel, sogenannte Makropinosomen, formen (Pfeilspitzen). N-WASP ist also nicht in den Prozess des Schließens dorsaler Aktinstrukturen zu Makropinosomen involviert. Diese Resultate stehen im Widerspruch zu den Konklusionen, die einer anderen Arbeit gezogen wurden (Legg et al., 2007).

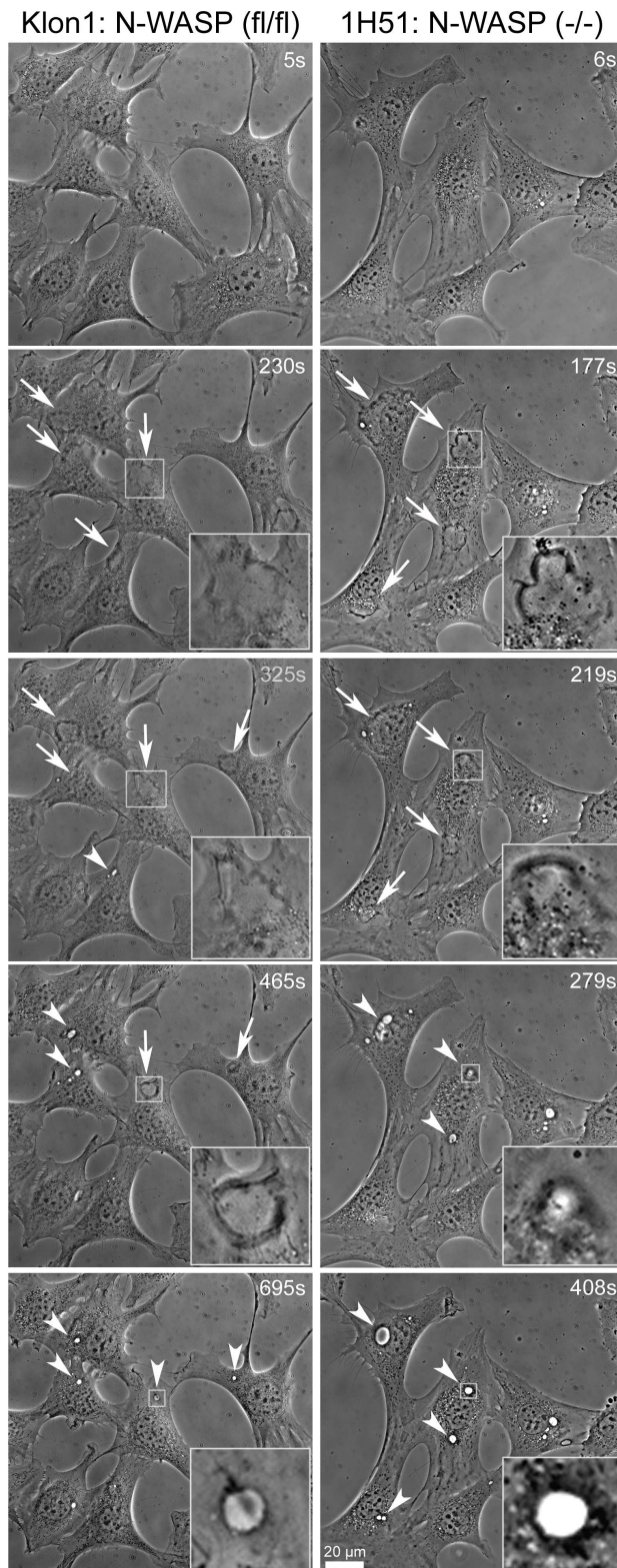


Abbildung 3.19: N-WASP-KO-Zellen bilden Makropinosomen.

N-WASP-Kontroll- (Klon1) und N-WASP-KO-(1H51) Zellen, wurden nach einer Verhungersphase von 24 h direkt am Mikroskop während der Videoaufnahme mit PDGF stimuliert. Die Abbildung zeigt einzelne Aufnahmen der Videosequenzen und die eingeblendeten Zeiten beziehen sich auf den Moment nach der Behandlung mit PDGF. Pfeile deuten auf PDGF-induzierte zirkuläre Strukturen, Pfeilspitzen weisen auf gebildete Makropinosomen. Die mit Quadrat markierten und jeweils unten rechts eingesetzten Bildausschnitte zeigen dorsale 'ruffles' bzw. geformte Vesikel in höherer Vergrößerung.

Es kann also zusammenfassend gesagt werden, dass N-WASP für die PDGF-induzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts weder in Bezug auf peripheres noch auf dorsales 'ruffling' einen Einfluss hat. N-WASP(-/-)-Zellen bzw. Zellen, in denen N-WASP mittels RNA-Interferenz transient herunterreguliert wurde, verhalten sich ähnlich zu den entsprechenden Kontrollen. Des weiteren sind N-WASP-'knockout'-Zellen in der Lage zirkuläre 'ruffles' nach Behandlung mit PDGF zu schließen und Makropinosomen zu bilden.

3.6 Rac als Effektor in der Signalkaskade des PDGF-R

Wie zuvor in Abschnitt 3.2.2 bzw. 3.4 erläutert wurde, führt die Stimulierung des PDGF-Rezeptors durch seinen Liganden PDGF indirekt zur Aktivierung der kleinen RhoGTPasen. Diese stellen eine Verbindung zwischen eingehenden Signalen an der Zellmembran und dem Aktinzytoskelett dar.

Aus Abbildung 3.12 wird deutlich, dass es durch die Behandlung mit PDGF-BB in den Kontrollfibroblasten (Genotyp Cdc42 fl/del) zu einer messbaren und signifikanten Aktivierung von Cdc42 kommt. Des weiteren wurde bereits gezeigt, dass Cdc42 in der Lage ist Rac zu aktivieren (Nobes and Hall, 1995b), und dass das Fehlen von Cdc42 nach HGF-Stimulierung in 'knockout' Zellen zu reduzierter Rac-Aktivität führt (Bosse et al., 2007).

Um zu überprüfen ob sich im PDGF-induzierten Signalweg ein ähnliches Bild in Bezug auf die Beteiligung von Cdc42 bei der Rac-Aktivierung zeigt, wurden mit Kontroll- und Cdc42-KO-Zellen Rac-Aktivierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die oben erläuterten GLISA-Assays (s. 2.6.4 und 3.2.2) genutzt.

Aus den in Abbildung 3.19 gezeigten Daten geht deutlich hervor, dass es in Kontrollzellen nach Stimulation des PDGF-R, wie bereits in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.7 zu beobachten, zu einer starken Aktivierung der kleinen RhoGTPase Rac kommt. Interessanterweise, und im Gegensatz zu HGF-Stimulierungen (Bosse et al., 2007), hat das Fehlen von Cdc42 keinen Einfluss auf die PDGF-vermittelte Rac-Aktivität. Die Cdc42(-/-)-Zellen zeigen sogar einen etwas höheren basalen Level an bereits aktivierten Rac-GTP. Der Aktivierungsgrad ist jedoch der gleiche.

Cdc42 spielt also eine bedeutende Rolle bei der Bildung zirkulärer dorsaler 'ruffles', aber diese scheint weder in der N-WASP-Aktivierung, noch in der Bildung von Makropinosomen oder der Aktivierung der GTPase Rac zu liegen. Die GTPase Rac scheint auch eine wichtige Rolle zu spielen, da ihre Aktivierung nach PI3-Kinase-Hemmung gestört ist, was mit reduzierter 'ruffle'-Bildung einhergeht (vergleiche 3.2 und 3.3).

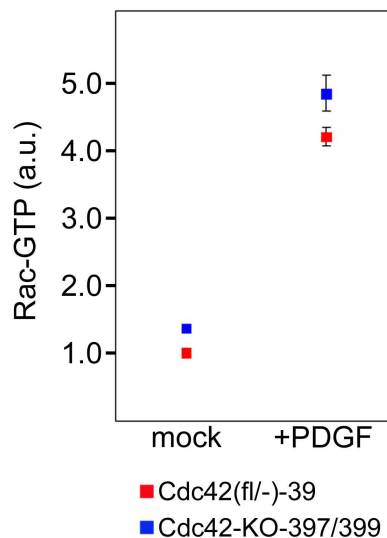


Abbildung 3.19: PDGF-BB stimuliert die Rac-Aktivierung in Cdc42-KO-Zellen.

Kontrollfibroblasten und Cdc42-defiziente Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät und nach 48 h Kultivierung ü./N. verhungert. Im Anschluss erfolgte die Stimulierung mit PDGF-BB (10 ng/mL) für 5 min, und die Weiterbehandlung entsprechend des GLISA-Protokolls. Der Graph zeigt die Rac-Aktivierung in den verwendeten Zellen nach PDGF- und Kontrollbehandlungen. Dargestellt sind Mittelwerte der jeweiligen Aktivierungsraten aus wenigstens 3 unabhängigen Experimenten und deren Standardfehler, wobei der PDGF-freie Ansatz in den Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) (mock) auf 1 normalisiert wurde.

Im Gegensatz zu Cdc42 hat Rac eine schon bekannte und bedeutende Rolle in der Bildung von Lamellipodien und peripheren 'ruffles' (Ridley et al., 1992). Um zu untersuchen welchen Einfluss Rac auf PDGF-induzierte Aktinreorganisation hat, wurde in Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) ein mit RNA-Interferenz vermittelter 'knockdown' von Rac1 durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, wurde dafür eine für Rac1-spezifische shRNA transfiziert und der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Herunterregulation des Rac-Proteins am effizientesten ist. Es handelt sich um den



Abbildung 3.20: Effizienter Rac1-'knockdown' 96 h nach Transfektion.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) wurden ausgesät und am folgenden Tag entweder mit der Rac1- bzw. Kontroll-shRNA transfiziert. 2-5 Tage nach Transfektion wurden Zelleextrakte genommen und mittels der Western Blot-Methode der Zeitpunkt ermittelt, an dem Rac1 am stärksten herunterreguliert ist. Tubulin diente als Ladekontrolle.

vierten Tag nach dem Einbringen des shRNA-Plasmids in die Zellen. Im folgenden wurde untersucht, inwiefern sich die reduzierte Expression von Rac1 auf die PDGF-

induzierte Aktinreorganisation auswirkt. Das verwendete shRNA-Plasmid erlaubt, wie oben beschrieben, auch hier die Einzelzellanalyse betroffener Zellen durch die simultane Expression von GFP. In Kontrollfibroblasten wurde nach Rac1-‘knockdown’ eine PDGF-Stimulation durchgeführt.

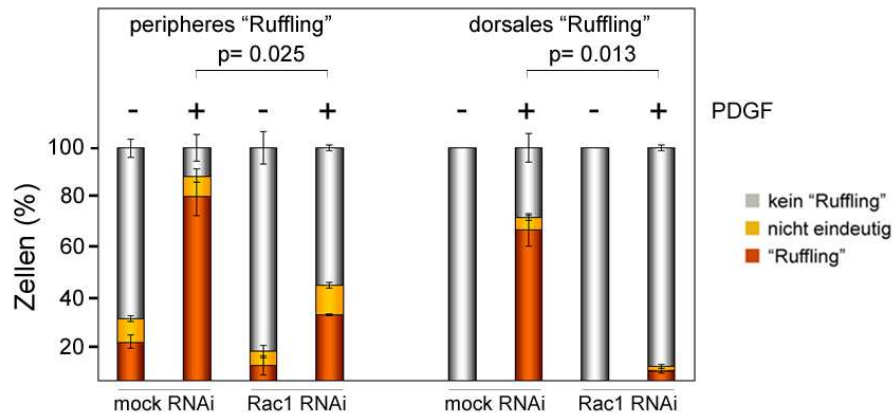


Abbildung 3.21: Rac1-‘knockdown’ führt zu reduziertem Membran ‘ruffling’

In Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) sollte durch Transfektion einer Rac1-spezifischen shRNA, die zur transienten Verminderung der Rac1-Expression führt, untersucht werden, inwiefern dies einen Einfluss auf die PDGF-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts hat. Als Kontrolle wurde ein Kontrollplasmid (mock RNAi) verwendet. In beiden Fällen kodiert das Plasmid ebenfalls für das grün fluoreszierende Protein (GFP). Gezeigt ist die Quantifizierung, die wie bereits in Abbildung 3.3 beschrieben wurde, erfolgte.

Im Kontrollansatz (mock RNAi) zeigt sich für die PDGF-induzierten Aktinstrukturen das gleiche Bild, wie bereits z.B. in Abbildung 3.17 beobachtet. Peripheres ‘ruffling’ und Lamellipodienbildung wird zu etwa 80 %, zirkuläre ‘ruffles’ auf der dorsalen Oberfläche der Zelle werden zu etwa 70 % stimuliert. Der transiente ‘knockdown’ von Rac1 wirkt sich deutlich auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach PDGF-Behandlung aus. Beide Arten von ‘ruffling’ sind stark reduziert, periphere ‘ruffles’ werden nur zu etwa 30 % gebildet, die Ausbildung dorsaler Aktinstrukturen wird fast vollständig unterbunden. Diese Ergebnisse implizieren, dass Rac1 wichtig ist in dieser durch PDGF-induzierten Signalkaskade.

3.7 Die Rolle des WAVE-Komplexes in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation

WAVE ist ein weiteres Mitglied der WASP/WAVE-Proteinfamilie, für die, wie bereits in Abschnitt 3.5 erwähnt, bekannt ist, dass sie Signale von kleinen RhoGTPasen wie Cdc42 und Rac an den Aktinnukleator Arp2/3-Komplex weiterleiten, der daraufhin aktiviert wird und somit zur Polymerisation von Aktin führt (Stradal et al., 2004).

Mitglieder dieser Familie zählen zu den prominentesten und potentesten Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes (Disanza et al., 2005; Higgs and Pollard, 2001). Der WAVE-Komplex wird durch die Interaktion mit aktivem Rac reguliert und führt zur Aktinpolymerisation in Lamellipodien. Der WAVE-Komplex setzt sich aus fünf Komponenten zusammen, von denen eine (Sra1) direkt mit Rac interagiert, eine (WAVE) direkt den Arp2/3-Komplex aktiviert, und zwei weiteren, strukturellen Komponenten (Abi und Nap1) und dem Peptid Brick1 (auch HSPC300). Es ist bekannt, dass die Integrität, d.h. die Anwesenheit aller Komponenten des WAVE-Komplexes essentiell ist für die Bildung von Lamellipodien und peripheren 'ruffles' (Steffen et al., 2004).

3.7.1 Lokalisation von WAVE2, Abi1 und Eps8 in zirkulären Aktinstrukturen

Um zu überprüfen ob prominente Regulatoren des 'rufflings' in der Zellperipherie ebenfalls von Bedeutung für zirkuläre 'ruffles' sind, wurden Lokalisationsstudien in Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Behandlung mit PDGF mit spezifischen Antikörpern u.a. gegen WAVE2, Abi1 und Eps8 in der Immunfluoreszenz gefärbt. Zusätzlich erfolgte die Anfärbung des Aktinzytoskeletts mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin. WAVE2 und Abi1 sind Komponenten des bereits erwähnten WAVE-Komplexes; bei Eps8 handelt es sich um einen Interaktionspartner von Abi1 (Disanza et al., 2004; Scita et al., 1999; Scita et al., 2001; Steffen et al., 2004).

In Abbildung 3.22 sind die mit spezifischen Antikörpern angefärbten Proteine WAVE2, Abi1 und Eps8 dargestellt. Das merge-Bild zeigt die übereinandergelegten Einzelaufnahmen. Erkennbar ist, dass alle Regulatoren von peripheren Aktinstrukturen erwartungsgemäß in PDGF-induzierten Lamellipodien lokalisieren (Pfeilspitzen). Des weiteren kann ebenfalls eine klare Lokalisierung in zirkulären 'ruffles' beobachtet werden (Pfeile).

Um diese Ergebnisse noch weiter zu verdeutlichen wurden zusätzlich konfokale Lokalisationsstudien der oben genannten Proteine vorgenommen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man mit einem sogenannten 'z-stack' des Immunfluoreszenzpräparats eine Auflösung in der dritten Dimension erzielen kann. Dabei werden mehrere Schnitte verschiedener Schärfeebenen erzeugt; über die Schichtung der einzelnen Aufnahmen wird ein dreidimensionales Bild rekonstruiert, welches in alle Richtungen gedreht werden kann.

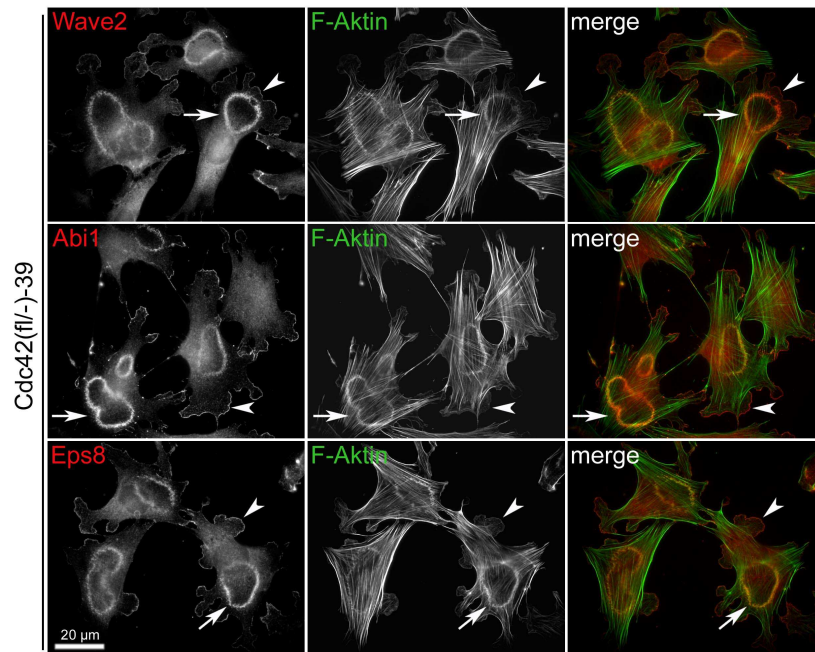


Abbildung 3.22: Lokalisation prominenter Regulatoren des peripheren ‘rufflings’ in zirkulären Aktinstrukturen.

In Kontrollzellen wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen WAVE2, Abi1 und Eps8 verwendet und die Zellen mit Phalloidin behandelt um Aktinfilamente zu färben. Gezeigt sind sowohl die Einzelaufnahmen als auch die übereinander gelegten Bilder (merge). Pfeilspitzen deuten auf Lamellipodien bzw. periphere ‘ruffles’; Pfeile weisen auf zirkuläres ‘ruffling’.

In Abbildung 3.23 sind konfokale Aufnahmen einer WAVE2- und F-Aktin-Färbung dargestellt. Periphere ‘ruffles’ sind in dieser Zelle nur schwach zu erkennen. Es wird deutlich sichtbar, dass WAVE2 in den PDGF-induzierten Aktinstrukturen auf der dorsalen Oberseite der Zelle angereichert ist. Ähnlich der Färbung für WAVE2, Abi1 und Eps8 im Lamellipodium, ist WAVE an der äußersten Spitze/Kante des zirkulären ‘ruffles’ angereichert. Die Menge des rekrutierten WAVE-Proteins in zirkuläre Strukturen ist deutlich höher als in Lamellipodien, wodurch das Signal breiter erscheint und das lamellipodiale Signal überstrahlt. Ähnliche Beobachtungen konnten für die konfokalen Aufnahmen von Abi1 und Eps8 gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

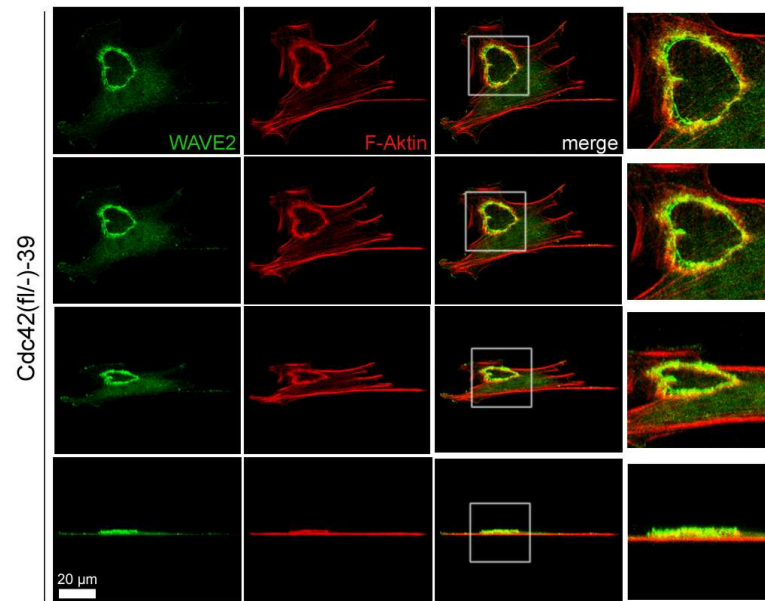


Abbildung 3.23: WAVE2 lokalisiert an der Spitze von zirkulären 'ruffles'.

Die WAVE-Komplex-Komponente WAVE2 wurde in Kontrollfibroblasten mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gefärbt; die Darstellung des Aktinzytoskeletts erfolgte durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin. Gezeigt sind Einzelbilder der Färbung von WAVE2 bzw. F-Aktin. Die Einzelaufnahmen sind einer am konfokalen 'Laser Scanning'-Mikroskop erstellten 3D-Rekonstruktion entnommen und zeigen unterschiedliche Rotationswinkel. Die rechte Spalte zeigt eine höhere Vergrößerung der in merge markierten Bildausschnitte (Faktor ~ 2.3-fach).

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass prominente Regulatoren des Aktinzytoskeletts in der Zellperipherie ebenfalls in PDGF-induzierten zirkulären 'ruffles' lokalisieren.

3.7.2 Nap1-'knockdown' beeinträchtigt PDGF-induziertes 'ruffling'

Im nächsten Schritt sollte die Rolle des WAVE-Komplexes in der durch PDGF-BB ausgelösten Signalkaskade näher untersucht werden. Dazu wurde in Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) ein 'knockdown' der WAVE-Komplex-Komponente Nap1 durchgeführt. Das Fehlen einer einzigen Komponente des Komplexes führt dazu, dass die übrigen Komponenten, aus zur Zeit noch ungeklärten Gründen, ebenfalls degradiert werden (Blagg et al., 2003; Rogers et al., 2003; Steffen et al., 2006). Der 'knockdown' wurde durch die Transfektion einer spezifischen Nap1 shRNA induziert. Der Zeitpunkt der effizientesten Herunterregulation der Nap1-Expression liegt bei 96 h nach der Transfektion.

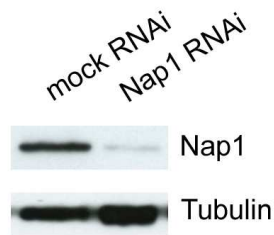


Abbildung 3.24: Effizienter Nap1-‘knockdown’ 96 h nach Transfektion.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) wurden ausgesät und am folgenden Tag entweder mit der Nap1- bzw. Kontroll-shRNA transfiziert. Vier Tage nach Transfektion wurden Zellextrakte genommen und mittels Western Blot das Ausmaß der Herunterregulation ermittelt. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Dies wird aus Abbildung 3.24 erkennbar. Weiterführende Experimente sollten nun ermitteln, ob Nap1-‘knockdown’, und damit auch die Herunterregulation des gesamten WAVE-Komplexes, einen Einfluss auf die PDGF-induzierte Aktinreorganisation hat. In Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass die PDGF-Behandlung im

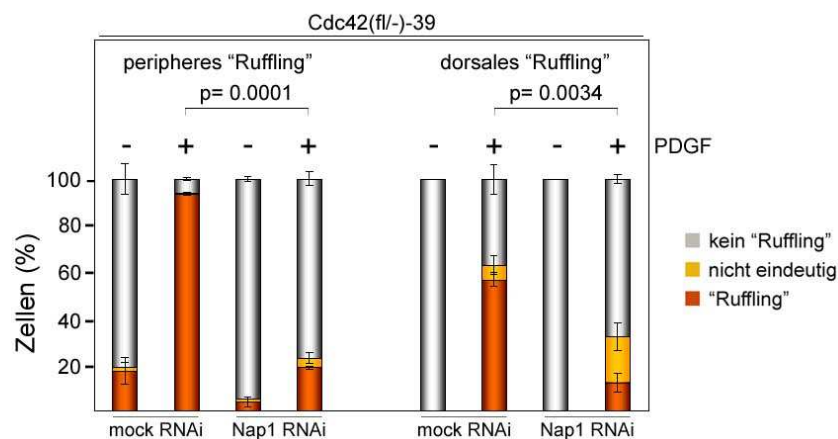


Abbildung 3.25: Nap1-‘knockdown’ beeinträchtigt PDGF-induziertes ‘ruffling’.

In Kontrollzellen (Cdc42 fl/-)-39) wurde durch Transfektion einer Nap1-spezifischen shRNA (Nap RNAi) eine vorübergehende Unterdrückung der Nap1-Expression induziert. Der Einfluss dieser Behandlung auf PDGF-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts wurde quantitativ ermittelt. Als Kontrolle wurde ein Kontrollplasmid (mock RNAi) verwendet. In beiden Fällen kodiert das Plasmid ebenfalls für das grün fluoreszierende Protein (GFP). Gezeigt sind die Resultate deren Auswertung, wie in Abbildung 3.3 beschrieben wurde, erfolgte.

Kontrollansatz zu prominenten Aktinstrukturen führt, sowohl in der Peripherie als auch auf der dorsalen Oberfläche der Zellen. Es kommt zu mehr als 90 % peripherem und zu etwa 60 % zirkulärem ‘ruffling’, was den Daten, die bereits beschrieben wurden, entspricht. Im Gegensatz dazu ist die PDGF-induzierte Aktinreorganisation in den Zellen, in denen die Nap1-Expression transient gehemmt wurde, stark beeinträchtigt. Peripheres ‘ruffling’ ist auf etwa 20 % reduziert, was mit früheren Befunden über die Rolle des WAVE-Komplexes in Lamellipodien übereinstimmt (Steffen et al., 2004).

Auch dorsale 'ruffles' sind auf etwa 10 % reduziert, was bestätigt, dass es sich hierbei um lamellipodiale Strukturen handelt, die WAVE-Komplex-abhängig gebildet werden. Wobei zu erwähnen ist, dass im Fall der zirkulären Aktinstrukturen viele Zellmorphologien nicht eindeutig zuzuordnen sind. Die lamellipodiale Restaktivität entspricht, wie in früheren Arbeiten (Steffen et al., 2006; Steffen et al., 2004), einer RNAi-typischen Restaktivität des WAVE-Komplexes.

Diese Daten bestätigen weiterhin, dass der Nap1-'knockdown' dem Phänotyp des bereits beschriebenen Rac1-'knockdowns' ähnelt.

3.8 Die nähere Charakterisierung von 'Abelson interactor 1' (Abi1)

In Abschnitt 3.7 wurde bereits etwas näher auf die Relevanz des WAVE-Komplexes für PDGF-induziertes Membran 'ruffling' eingegangen. Es konnte gezeigt werden, dass WAVE-Komplex-Komponenten wie WAVE2 und Abi1 sowohl in peripheren als auch zirkulären 'ruffles' lokalisieren. Des weiteren führt der durch RNA-Interferenz vermittelte transiente 'knockdown' von Nap1, einer dritten Komponente des WAVE-Komplexes, was dessen Degradierung zur Folge hat, zu einer starken Reduktion beider Arten von Aktinstrukturen im Signalweg des PDGF-R (Abbildung 3.25).

Abi1 ('Abelson interactor 1') übernimmt als Bestandteil des WAVE-Komplexes eine wichtige Funktion in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Abi-Proteine haben darüber hinaus zusätzliche Funktionen in Komplex mit anderen Proteinen, wie z.B. zusammen mit Eps8 und Sos1 in einem trimären Komplex als RacGEF (Scita et al., 1999), oder direkt als Bindeprotein und Aktivator von N-WASP (Innocenti et al., 2005).

3.8.1 Generierung von Abi1-'knockout' Fibroblasten

Um die Rolle von Abi1 als Effektor verschiedener Signalkaskaden näher zu charakterisieren, wurden Abi1-'knockout'-Fibroblasten generiert. Die partielle Deletion des Abi1-Gens aus murinen Abi1(fl/fl)-Vorläuferzellen (Abi1#3; Abi1#8), die freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Dr. Leszek Kotula (New York Blood Center) zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte durch den Einsatz der Cre-Rekombinase (s. 2.7.8).

Um zu kontrollieren, ob der Einsatz der Cre-Rekombinase zu einer erfolgreichen Deletion von Exon1 des Abi1-Gens geführt hat, wurde zum einen genomische DNA isoliert, die für die Genotypisierung der verschiedenen Zelllinien mittels PCR verwendet

wurde; zum anderen sollte mit Hilfe von Zellextrakten auf Proteinebene der Abi1-‘knockout’ überprüft werden. Die erfolgreiche Deletion von Exon1 des Abi1-Gens ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

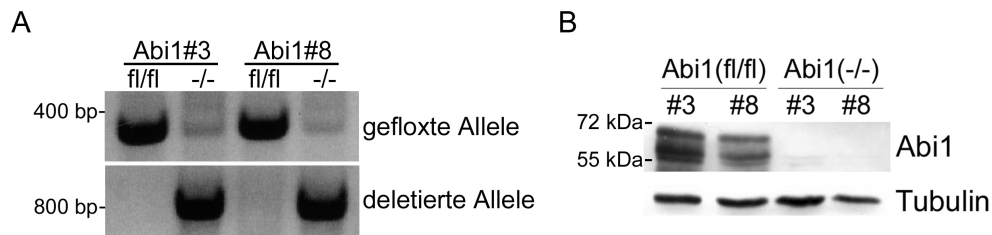


Abbildung 3.26: Erfolgreiche Deletion von Exon1 des Abi1-Gens.

In Abi1(fl/fl)-Vorläuferfibroblasten (Bezeichnung #3; #8) wurde die partielle Deletion von Abi1 durch die ektopische Expression der Cre-Rekombinase vorgenommen. Nach einer Selektionsdauer von 120 h mit Puromycin, schloss sich die Kultivierung mit normalem Wachstumsmedium an. Nach Isolierung genomischer DNA bzw. der Anfertigung von Zellextrakten dieser Zellpopulationen konnte der erfolgreiche Abi1-KO auf (A) DNA- und (B) Proteinebene nachgewiesen werden.

(A) Genotypisierung der Zelllinien. Die obere Bande dient dem Nachweis der geflochtenen, die untere dem Nachweis der deletierten Allele. (B) Untersuchung der Abi1-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot; Tubulin diente als Ladekontrolle.

Abi1 weist im Western Blot ein apparentes Molekulargewicht von etwa 50-65 kDa auf (Abbildung 3.26 B). Das Bandenmuster wird durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung verursacht (Biesova et al., 1997). Nach Cre-Rekombinase-vermittelter Deletion kann in den Zellen keine Expression von Abi1 mehr nachgewiesen werden. Aus dem Tubulinnachweis derselben Proben kann geschlossen werden, dass etwa gleiche Proteinmengen aufgetragen worden sind.

Zusammenfassend konnte auf DNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass die Deletion des Abi1-Gens und infolgedessen die Generierung von Abi1-‘knockout’-Zellen aus Abi1(fl/fl)-Vorläuferzellen erfolgreich war.

3.8.2 Etablierung von Abi1-KO-Einzelklonen aus der Mischpopulation

Für die nähere Untersuchung eines möglichen Phänotyps in den in Abschnitt 3.8.1 generierten Abi1-KO-Mischpopulationen (Abi1(-/-)#3 bzw. #8) wurde eine Einzelzellklonierung durchgeführt (s. 2.7.9), d.h. die etablierten Zelllinien - je Vorläuferlinie wurden 10 Klone hergestellt - gehen aus einer einzigen Zelle hervor. In den Abi1-KO-Einzelklonen sollte die Proteinexpression weiterer Komponenten des WAVE-Komplexes, wie WAVE2, Nap1 oder Sra1, im Vergleich zu Abi(fl/fl)-Kontrollfibroblasten gemessen werden (nicht gezeigte Daten), da, wie bereits in Abschnitt 3.7 beschrieben wurde, das Fehlen einer Komponente zur Degradierung des

gesamten Komplexes führt. Anhand der ermittelten Expressionsmuster wurden aus den jeweils zehn *Abi1*(-/-)-Einzelklonen der Linien #3 bzw. #8 je zwei Zelllinien ausgewählt, mit denen weiterführende Experimente durchgeführt wurden. Dabei handelt es sich um die Klone *Abi1*(-/-)#3-6 und #3-11 bzw. um die Klone *Abi1*(-/-)#8-7 sowie #8-11.

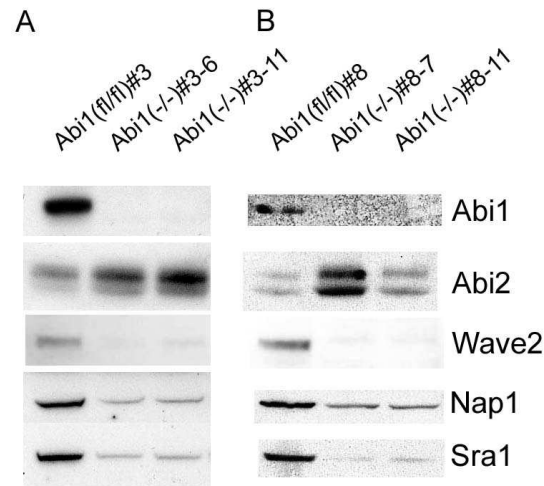


Abbildung 3.27: Die Expression weiterer WAVE-Komplex-Komponenten ist reduziert in *Abi1*-‘knockout’-Zellen.

Gesamtzellextrakte von *Abi1* Kontrollzellen und den entsprechenden *Abi1* ‘knockout’-Klonen wurden mit semiquantitativem Western Blotting auf die Expression von *Abi1*, *Abi2*, *WAVE2*, *Nap1* sowie *Sra1* überprüft. Darstellung der Proteinexpressionen in den (A) *Abi1*#3-Zelllinien bzw. (B) *Abi1*#8-Zellen.

In Abbildung 3.27 sind die Proteinexpressionsmuster von *Abi1*, *Abi2*, *WAVE2*, *Nap1* und *Sra1* in *Abi1*-Kontroll- und -KO-Zellen dargestellt. Gezeigt sind *Abi1*-Kontrollzellen #3 sowie #8 mit den dazugehörigen ‘knockout’-Linien (A, B). Die *Abi1*(fl/fl)-Vorläuferzellen exprimieren *Abi1*, wohingegen, wie zu erwarten, in den *Abi1*-KO-Zellen keine *Abi1*-Expression mehr nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *Abi2* im Vergleich zu den Kontrollzellen in *Abi1*-‘knockout’-Zellen erhöht. Für die dargestellten weiteren Komponenten des WAVE-Komplexes *WAVE2*, *Nap1* und *Sra1* kann beobachtet werden, dass die detektierbare Proteinmenge deutlich verringert ist.

3.8.3 Die Lokalisation von *Abi1/2* in PDGF-induzierten Aktinstrukturen

Aus den in Abschnitt 3.8.1 und 3.8.2 ermittelten Daten geht hervor, dass aus *Abi1*(fl/fl)-Vorläuferzellen erfolgreich *Abi1*-‘knockout’-Zelllinien etabliert worden sind. Dies wurde sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Um die Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurden von *Abi1*(fl/fl)#3- bzw. *Abi1*(-/-)#3-11-Zellen nach

vorangegangener PDGF-Stimulierung Immunfluoreszenzen angefertigt. Die Anfärbung von Abi1 erfolgte zum einen mit einem Antikörper, der sowohl Abi1 als auch Abi2 erkennt (s. Abbildung 3.28 A), und zum anderen mit einem Abi1-spezifischen Antikörper (s. Abbildung 3.28 B).

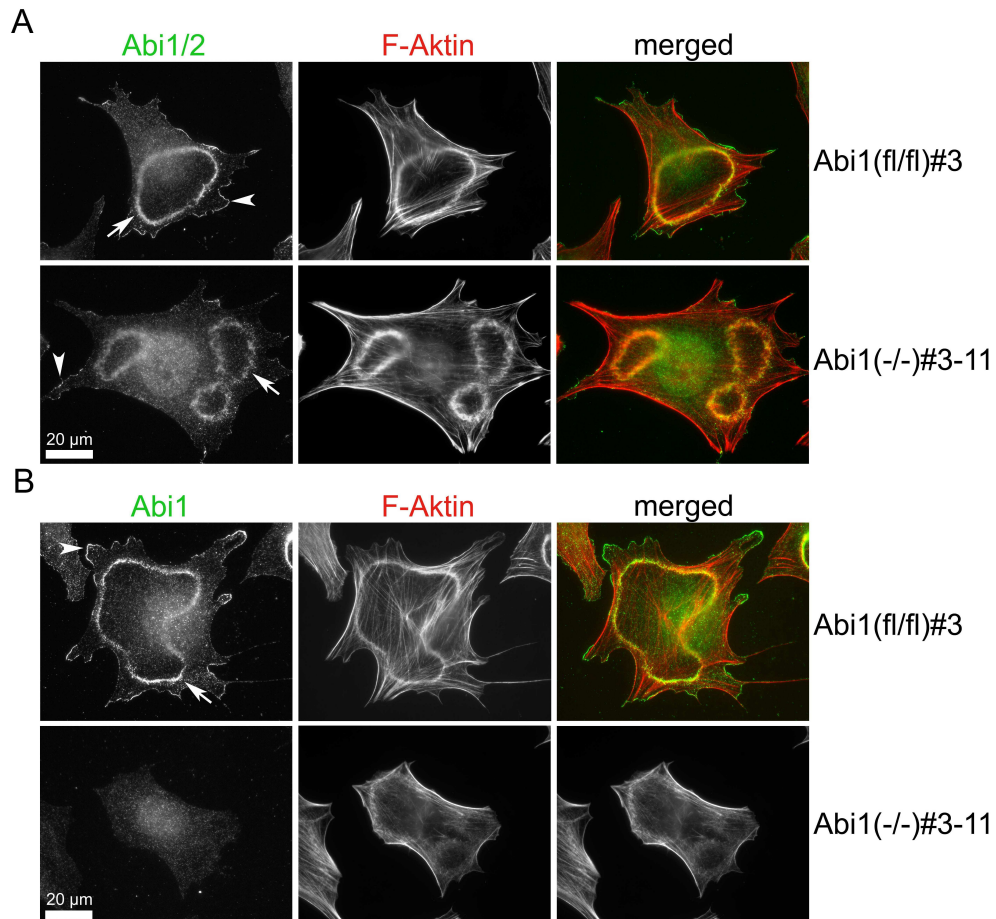


Abbildung 3.28: Abi1 ist in der Immunfluoreszenz nicht detektierbar.

Abi1-Kontroll- und -KO-Zellen wurden nach etwa 24 h Kulturzeit ü./N. verhungert und im Anschluss für 5 min mit PDGF-BB (10 ng/mL) für 5 min stimuliert. Die Anfärbung von Abi1 erfolgte zum einen mit einem Antikörper, der Abi1 und Abi2 erkennt (A), und zum anderen mit einem Abi1-spezifischen monoklonalen Antikörper (B). Das Aktinzytoskelett wurde durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin gefärbt. Pfeilspitzen deuten auf die Lokalisation von Abi1/2 in peripheren, Pfeile deuten auf die Lokalisation in dorsalen 'ruffles'.

Zusätzlich wurde das Aktinzytoskelett mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin visualisiert. Aus Abbildung 3.28 ist ersichtlich, dass es, wie auch schon in den zuvor beschriebenen Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) (s. Abschnitt 3.1), nach einer Verhungerungszeit von 16-18 h und einer sich anschließenden PDGF-BB-Behandlung zu einer prominenten Reorganisation des Aktinzytoskeletts, in Form von peripheren und zirkulären 'ruffles', kommt. In beiden Strukturen, Lamellipodien und zirkulären 'ruffles', kann eine eindeutige Lokalisation von Abi1 und/oder Abi2 nachgewiesen werden. In den Abi1-'knockout'-Zellen führt nur der Antikörper, der sich ebenfalls gegen Abi2 richtet, zu

einer schwachen Lokalisation in 'ruffles' an der Zellperipherie (Pfeilspitze) und auch in zirkulären Aktinstrukturen (Pfeil), wohingegen der Abi1-spezifische Antikörper erwartungsgemäß keine Lokalisation zeigt (B).

3.8.4 PDGF-induziertes dorsales 'ruffling' ist reduziert in Abi1(-/-)-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten (3.8.1-3.8.3) konnte gezeigt werden, dass aus Abi1(fl/fl)-Kontrollzellen erfolgreich Abi1-'knockout'-Einzelklone etabliert werden konnten. Zudem wurde in Abschnitt 3.7 dargelegt, dass der transiente 'knockdown' der WAVE-Komplex-Komponente Nap1 sowohl PDGF-induziertes peripheres als auch zirkuläres 'ruffling' stark beeinträchtigt. Um zu untersuchen ob in den Abi1-KO-Zellen ein ähnlicher Phänotyp zu beobachten ist, wurden Abi1-Kontroll- und -'knockout'-Zellen ü./N. für 16-18 h verhungert und anschließend mit PDGF stimuliert.

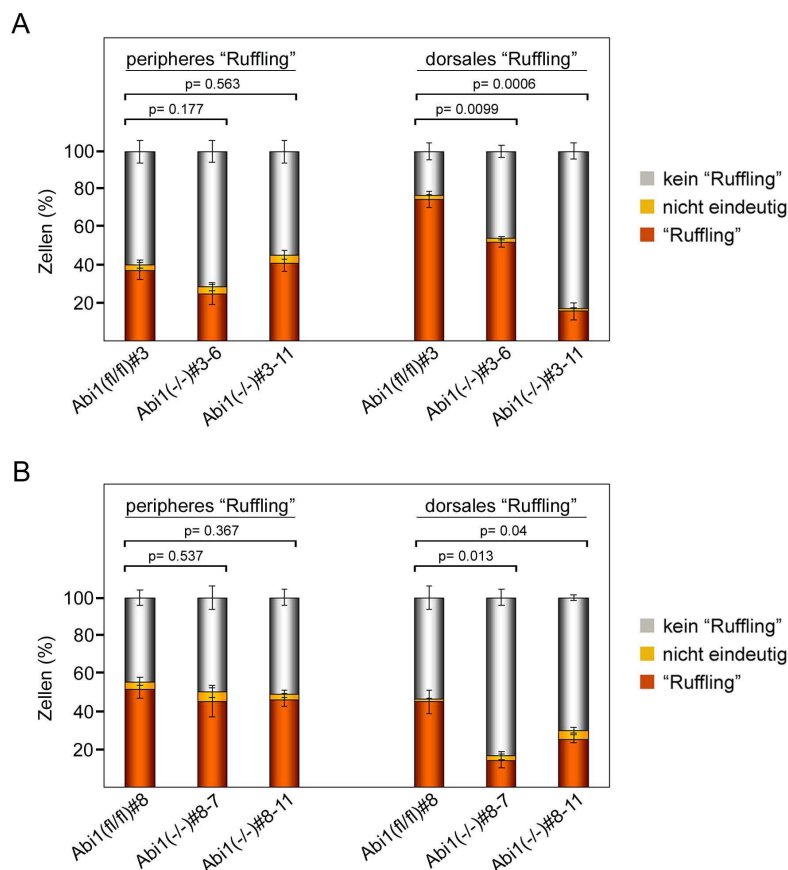


Abbildung 3.29: Reduzierte Bildung zirkulärer 'ruffles' in Abi(-/-)-Zellen.

Abi1 Kontroll- und Abi1-defiziente Zellen wurden für 24 h auf Deckgläsern kultiviert, ü./N. verhungert und anschließend mit PDGF (10 ng/mL) stimuliert. Die Versuche wurden parallel für #3 (A) und #8 (B) Kontrollen und den beiden entsprechenden KO-Linien durchgeführt. Die Quantifizierung und Einstufung der verschiedenen Zellmorphologien nach Phalloidininfärbung erfolgte wie bereits beschrieben.

Unstimulierte Zellen wurden in diesem Ansatz nicht berücksichtigt, daher kann keine Aussage über die basale Aktivität und die Stärke der Stimulation getroffen werden. Dennoch ist es möglich die Zellen untereinander zu vergleichen.

Aus Abbildung 3.29 geht hervor, dass das Fehlen von Abi1 keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung PDGF-induzierter peripherer Aktinstrukturen zeigt; es wird zu etwa 40-50 % stimuliert. Die verstärkte Abi2-Expression in Abi1-KO-Zellen (s. Abbildung 3.27) kann das Fehlen von Abi1 eventuell kompensieren. Dies ist bei Nap1-RNAi nicht möglich, da das zweite Nap1-'like' Gen nur im hämatopoetischen System vorkommt und erklärt möglicherweise den weniger dramatischen Phänotyp. In weiterführenden Experimenten muss daher untersucht werden, ob und wenn ja, welche Funktionen von Abi1 durch Abi2 substituiert werden können.

Anders als beim peripheren 'ruffling' führt der Verlust von Abi1 in den getesteten Abi1-KO-Zellen zu einer signifikanten Reduktion zirkulärer 'ruffles' auf der dorsalen Oberseite der Zelle. Die Ausprägung dieser Reduktion ist in den untersuchten Abi1-'knockout'-Zelllinien unterschiedlich stark.

Zusammenfassend zeigen die in Abschnitt 3.8 präsentierten Daten, dass aus Abi1(fl/fl)-Zellen Abi1-KO-Zelllinien etabliert werden konnten. Vorläufige Analysen zeigen in Abi1-defizienten Zellen einen Defekt in der PDGF-induzierten Bildung zirkulärer dorsaler, aber nicht peripherer 'ruffles' auf.

3.9 Rasterelektronenmikroskopische Analyse zirkulärer 'ruffles'

Im folgenden Schritt sollte die Morphologie der PDGF-induzierten zirkulären Aktinstrukturen durch Aufnahmen an einem Rasterelektronenmikroskop (REM) detaillierter betrachtet werden.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) (englisch: Scanning Electron Microscope, SEM) wird ein Elektronenstrahl von wenigen Nanometer Durchmesser in einem bestimmten Muster über die mit einem Edelmetall bedampfte Objektoberfläche geführt (gerastert). Je nach Verfahren werden reflektierte oder Sekundärelektronen zur Erzeugung eines Bildes der Objektoberfläche (Topographie) genutzt. Die so erzeugten Bilder weisen eine hohe Tiefenschärfe auf.

Um die unterschiedlichen Morphologien der Zelle während der Stadien der Bildung zirkulärer 'ruffles' von Beginn ihres Erscheinens an, etwa 2-5 min nach PDGF-Stimulation, bis hin zum Schließen, etwa 12-15 min nach PDGF-Behandlung, zu beobachten, wurde eine Zeitreihe angefertigt. Dazu wurden Kontrollfibroblasten

(Cdc42 fl/-), nach vorangegangener Verhungerungsphase von 16-18 h ü./N., mit PDGF-BB stimuliert. Die Stimulierung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten, zwischen 3-15 min nach Wachstumsfaktorzugabe, durch Fixierung der Zellen gestoppt. Die unterschiedlichen Morphologien der zirkulären 'ruffles' sind chronologisch angeordnet (s. Abbildung 3.30 (1-6)). Es ist zu erkennen, dass nach Zugabe von PDGF weit geöffnete, ringförmige 'ruffles', die sich über die gesamte Zelloberfläche erstrecken können, gebildet werden. Im weiteren Verlauf heben sich diese Strukturen an und beginnen sich zu verengen/zusammenzuziehen (Abbildung 3.30 (1-3)).

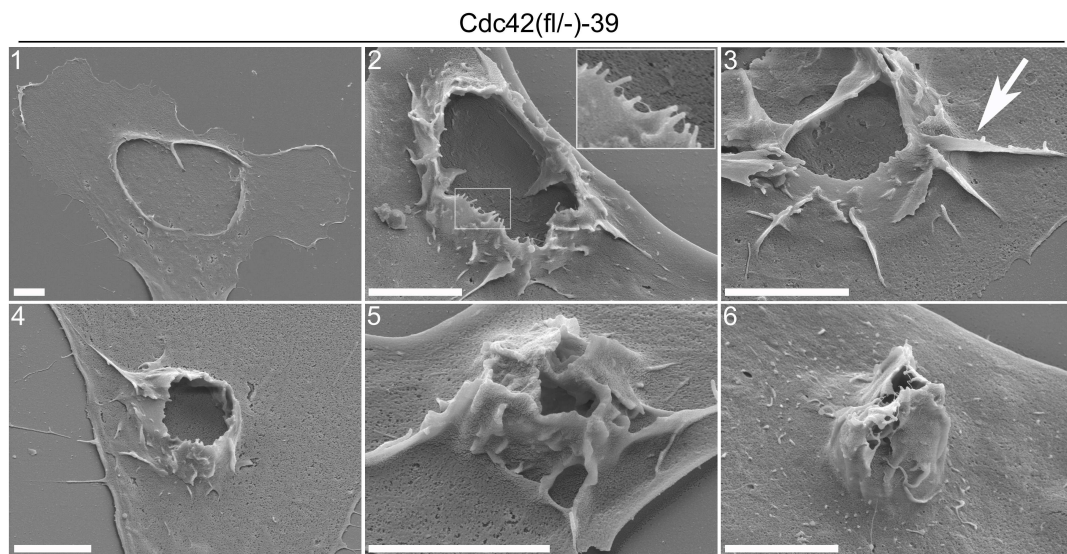


Abbildung 3.30: Dorsale 'ruffles' in der Rasterelektronenmikroskopie.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden nach einer Verhungerungszeit von 16-18 h mit PDGF-BB (10 ng/mL) stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten in einem Zeitraum von 3-15 min nach Zugabe von PDGF mit 2.5 % Glutaraldehyd in DMEM fixiert. Die Nummerierung (1-6) entspricht dem chronologischen Verlauf. Der Pfeil deutet auf segelartige Strukturen an den Außenseiten der zirkulären 'ruffles'. Der Ausschnitt in Bild 2 zeigt eine höhere Vergrößerung von in dorsalen 'ruffles' eingebetteten Filopodien. Der Maßstab entspricht 2 µm.

Mit fortlaufender Konstriktion des 'ruffles' erheben sich die Membranschichten weiter (Abbildung 3.30 (4-6)), bevor sie sich – nun fast senkrecht auf der Zelloberfläche stehend – vollständig schließen und von der Oberfläche verschwinden. Bei der Betrachtung der zirkulären 'ruffles' fallen segelartige Strukturen auf (Bild3, Pfeil), die möglicherweise stabilisierend wirken. Außerdem sind zum einen filopodienartige, also fingerähnliche Aktinstrukturen, die über den Membransaum hinausreichen, in die PDGF-induzierten dorsalen 'ruffles' eingebettet (s. Abbildung 3.30 Bild2). Wenn man nach Phalloidininfärbung periphere und dorsale Aktinstrukturen bei größtmöglicher Auflösung im Fluoreszenzmikroskop vergleicht (Abbildung 3.31), so ist deutlich zu erkennen, dass zirkuläre 'ruffles' zahlreiche 'microspikes' aufweisen, bei welchen es

sich um filopodienartige Aktinbündel im Lamellipodium handelt. In Abbildung 3.31 ist ein Kontrollfibroblast im peripheren (Abbildung 3.31 A) bzw. im dorsalen (Abbildung 3.31 B) Fokus dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt im peripheren Fokus zeigt den Teil eines Lamellipodiums; der im dorsalen Fokus Teil eines dorsalen 'ruffles'. In beiden Strukturen sind 'microspikes' zu beobachten.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass zirkuläres 'ruffling' eine prominente Zellantwort von Fibroblasten auf PDGF-Stimulierung ist, die sich über die gesamte dorsale Zelloberfläche erstrecken kann. Die Strukturen schließen sich im Verlauf der Zeit, wobei segelartige Strukturen, mit potentiell stabilisierender Funktion, auftreten. Zudem wurden zahlreiche Filopodien und 'microspikes' beobachtet.

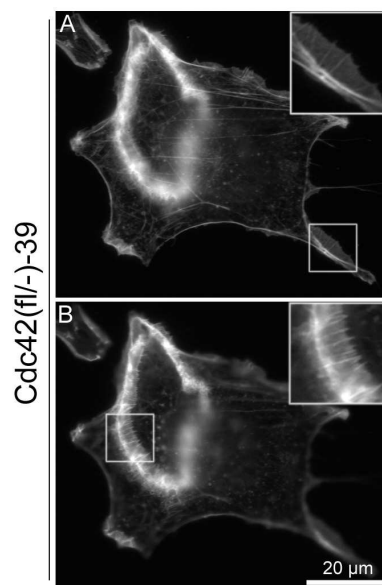


Abbildung 3.31: 'Microspikes' in zirkulären 'ruffles'.

Kontrollzellen (Genotyp Cdc42 fl/del) wurden für 16-18 h verhungert und anschließend mit PDGF stimuliert (10 ng/mL), fixiert und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Die Abbildung zeigt eine Darstellung im peripheren (A) bzw. dorsalen (B) Fokus der Zelle. In den vergrößerten Bereichen sind Ausschnitte eines Lamellipodiums bzw. zirkulären 'ruffles' mit integrierten 'microspikes' gezeigt.

3.10 Lokalisation filopodialer Marker in zirkulären 'ruffles'

Die oben genannten Experimente (REM und hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie) führen zur Frage nach einer Rolle von Filopodien und sogenannten 'microspikes' in zirkulären 'ruffles' (s. Abschnitt 3.9). Bei Filopodien und 'microspikes' handelt es sich um aktinreiche Strukturen, in denen die Aktinfilamente zu dichtgepackten parallelen Bündeln zusammengefasst sind. Von 'microspikes' spricht man, solange diese in ein Lamellipodium eingebettet sind und sich gemeinsam mit diesen verschieben; von

Filopodien, wenn sie unabhängig von Lamellipodien aus dem Zellsaum vortreten. Man geht davon aus, dass 'microspikes' Vorläufer von Filopodien sein können (Block et al., 2008; Small et al., 2002; Steffen et al., 2006). Filopodien wurden als Antennen der Zelle beschrieben, die zum Erkunden der Umwelt dienen. Sowohl Filopodien als auch 'microspikes' wird eine prominente Rolle bei Prozessen der Zellmigration zugeschrieben (Mattila and Lappalainen, 2008).

Um zu untersuchen ob bekannte Markerproteine dieser Aktinstrukturen, wie Fascin, VASP und MyosinX, ebenfalls in Filopodien und 'spikes' der zirkulären 'ruffles' auftreten, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt.

Fascin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das durch zwei Aktin-Bindungsdomänen die Fähigkeit besitzt Aktin bzw. Aktinfilamente zu bündeln. Es handelt sich hierbei um ein klassisches Markerprotein für 'microspikes' und auch Filopodien (Adams, 2004; Kureishy et al., 2002; Svitkina et al., 2003; Vignjevic et al., 2006).

In Abbildung 3.32 sind konfokale Aufnahmen einer Fascin-Färbung dargestellt. Dazu

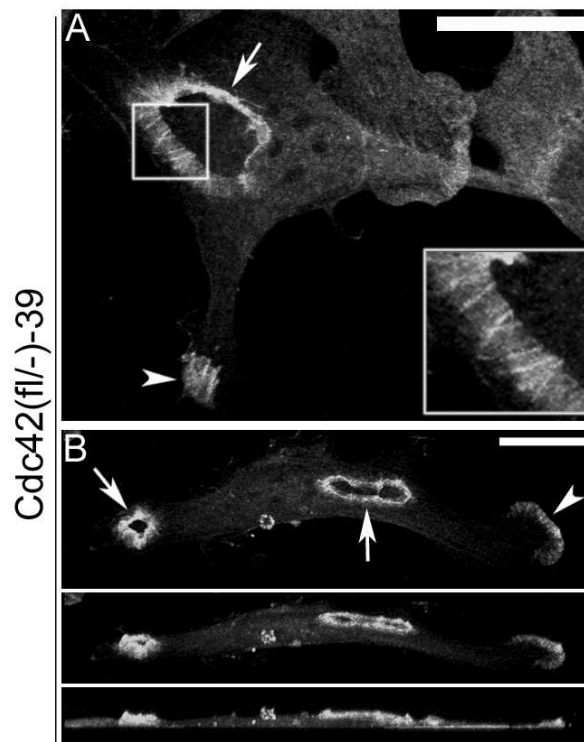


Abbildung 3.32: Fascin lokalisiert in PDGF-induzierten Aktinstrukturen.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden ü./N. verhungert, für 5 min mit PDGF-BB stimuliert, mit Methanol fixiert und mithilfe eines monoklonalen Fascin-Antikörpers gefärbt. Gezeigt ist eine 3D-Rekonstruktion aus konfokalen Aufnahmen. Der vergrößerte Ausschnitt in (A) verdeutlicht die in das dorsale 'ruffle' eingebetteten 'microspikes'. Die Einzelaufnahme in (B) zeigt die Zelle aus unterschiedlichen Winkeln. Die Pfeilspitze weist auf ein prominentes Lamellipodium, die Pfeile auf zirkuläre 'ruffles'. Der Maßstab entspricht 20 µm.

wurden Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) mit PDGF-BB stimuliert, mit Methanol fixiert und anschließend mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers, der sich gegen

Fascin richtet, gefärbt. Bei der konfokalen 'Laser Scanning'-Mikroskopie kann aus der Aufnahme verschiedener fokaler Ebenen ein dreidimensionales Bild rekonstruiert werden. Abbildung 3.32 zeigt, dass Fascin 'microspikes' im Lamellipodium (Pfeilspitze) und in zirkulären 'ruffles' (Pfeil) gleichermaßen anfärbt. Der vergrößerte Bereich in (A) zeigt einen Ausschnitt der Aktinstruktur auf der dorsalen Oberfläche der Zelle mit zahlreichen integrierten 'spikes', wie bereits in Abbildung 3.31 gesehen. Abbildung 3.32 (B) verdeutlicht zudem das Anheben der zirkulären 'ruffles' auf der dorsalen Zelloberfläche beim Prozess des Schließens.

VASP gehört zur Ena/VASP-Proteinfamilie, für die beschrieben worden ist, dass sie in Säugerzellen in Fokalkontakten, am Leitsaum des Lamellipodiums und an den Spitzen von Filopodien lokalisieren (Lanier et al., 1999; Reinhard et al., 1992). Für VASP konnte gezeigt werden, dass es u.a. eine Funktion in der Filopodienbildung als Aktinfilamentelongator übernimmt (Breitsprecher et al., 2008; Schirenbeck et al., 2006). Durch Immunfluoreszenzfärbung von VASP mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper sollte überprüft werden, wo endogenes VASP, in mit PDGF-behandelten Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/del) lokalisiert.

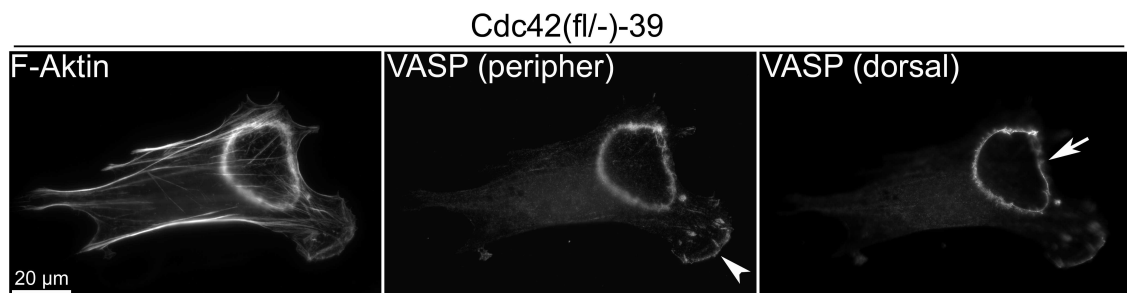


Abbildung 3.33: VASP als Markerprotein für Fokalkontakte, Lamellipodien und dorsale 'ruffles'.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden nach PDGF-Stimulierung mit einem gegen VASP-spezifischen polyklonalen Antikörper und fluoreszentem Phalloidin gefärbt. Um die Lokalisierung von VASP deutlicher darzustellen, sind Aufnahmen mit dem Fokus auf die Zellperipherie (Substratebene) und auf das dorsale 'ruffle' gezeigt. Die Pfeilspitze deutet auf den Saum des Lamellipodiums; außerdem sind schwach Fokalkontakte zu erkennen. Der Pfeil weist auf das zirkuläre 'ruffling'.

Es ist deutlich zu erkennen, dass VASP im Bereich der durch PDGF-induzierten Aktinstrukturen wie dem Lamellipodium (Pfeilspitze), in Fokalkontakten und zirkulären 'ruffles' lokalisiert (Pfeil). Um dies besser hervorzuheben wurde die Zelle in zwei unterschiedlichen fokalen Ebenen dargestellt.

MyosinX ist ein Mitglied der sogenannten unkonventionellen Myosine, welche die Fähigkeit besitzen sich bidirektional entlang von Aktinfilamenten prozessiv zu bewegen.

Es lokalisiert an der Spitze von Filopodien und 'microspikes'. Des weiteren wurde bereits beschrieben, dass es u.a. an dem Transport von VASP an die Filopodienspitze involviert ist. Die genaue Funktion von MyosinX im Prozess der Filopodienbildung bleibt jedoch unklar (Berg and Cheney, 2002; Bohil et al., 2006; Tokuo and Ikebe, 2004).

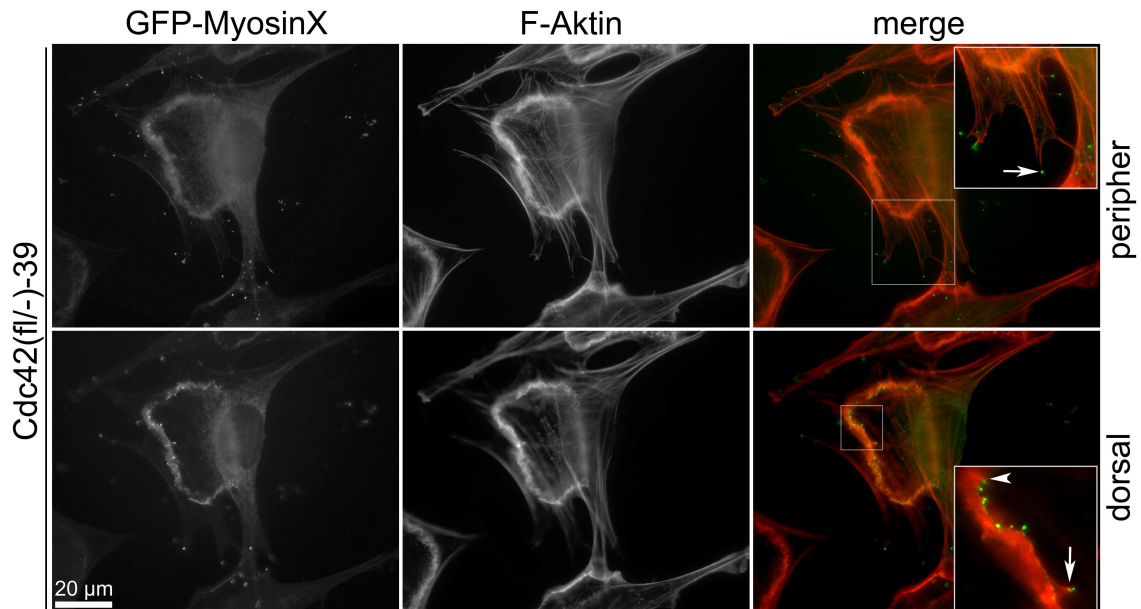


Abbildung 3.34: Lokalisation von MyosinX an der Spitze von Filopodien und 'microspikes'.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) wurden mit einem GFP-MyosinX-Konstrukt transfiziert, verhungert und mit PDGF stimuliert. Die Visualisierung des Aktinzytoskeletts erfolgte durch Färbung der fixierten Zellen mit fluoreszentem Phalloidin. Dargestellt sind die Einzelaufnahmen von GFP-MyosinX und F-Aktin im peripheren sowie dorsalen Fokus, und merges. Pfeile deuten auf die Spitze von Filopodien; die Pfeilspitze weist auf die Spitzen von 'microspikes'.

Um die subzelluläre Lokalisation von MyosinX in zirkulären 'ruffles' zu untersuchen, wurde in Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) die transiente, ektopische Expression von GFP-markiertem MyosinX (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Cheney, Universität in North Carolina) induziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen verhungert und mit PDGF-BB behandelt.

Im peripheren Fokus der Abbildung 3.34 ist zu erkennen, dass MyosinX exklusiv, wie bereits beschrieben, an den Spitzen von Filopodien lokalisiert (Pfeil).

Dies trifft auch auf die Spitze der filopodienartigen Strukturen und 'spikes' in zirkulären 'ruffles' zu, welche MyosinX an ihrer Spitze tragen (siehe auch merge des dorsalen Fokus von Abbildung 3.34).

Prominente Markerproteine für Filopodien und 'microspikes' wie Fascin, VASP und MyosinX können also ebenfalls in PDGF-induzierten zirkulären 'ruffles' detektiert werden, was dafür spricht, dass diese Strukturen prinzipiell wie der Leitsaum einer wandernden Zelle aufgebaut sind.

3.11 Fascin-‘knockdown’ beeinträchtigt PDGF-induziertes dorsales ‘ruffling’

Wie bereits in den Abschnitten 3.9 und 3.10 gezeigt werden konnte, umfassen PDGF-induzierte zirkuläre ‘ruffles’ aktinreiche Strukturen, wie Lamellipodien, Filopodien und ‘microspikes’.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der Fascin-Expression (mit RNAi) zu einer Verminderung von ‘microspikes’ und Filopodien führt, Lamellipodien selbst aber nicht beeinträchtigt (Vignjevic et al., 2006).

Um die Rolle von Fascin in den PDGF-induzierten zirkulären ‘ruffles’ näher zu charakterisieren, wurde in Kontrollfibroblasten (Genotyp *Cdc42 fl/-*) durch RNA-Interferenz die Expression von Fascin transient unterdrückt (s. 2.7.11) (Fascin shRNA Konstrukte freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Danijela Vignjevic, Northwestern Universität).

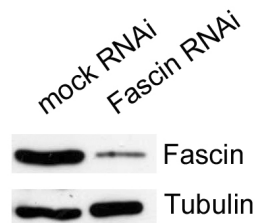


Abbildung 3.35: Effizienter Fascin-‘knockdown’ 96 h nach Transfektion.

Kontrollfibroblasten (*Cdc42 fl/-*) wurden ausgesät und am folgenden Tag entweder mit der Fascin- bzw. Kontroll-shRNA transfiziert. Vier Tage nach Transfektion war der Grad der Fascin-Reduktion am stärksten (mittels Western Blot detektiert). Tubulin diente als Ladekontrolle.

Im ersten Schritt wurde nach erfolgreicher Transfektion der shRNA der Zeitpunkt bestimmt, der zu einer effizienten Herunterregulation von Fascin führt. Es stellte sich heraus, dass der ‘knockdown’-Effekt von Fascin 96 h nach der Transfektion am effektivsten ist.

In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob der transient vermittelte Fascin-‘knockdown’ einen Einfluss auf die PDGF-induzierte Aktinreorganisation hat.

Abbildung 3.36 (A) zeigt exemplarische Aufnahmen von Kontrollfibroblasten (*Cdc42 fl/-*) nach Fascin-‘knockdown’ in denen zusätzlich Fascin mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper sowie F-Aktin durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin angefärbt sind. Die einzelnen Aufnahmen wurden zu einem merge-Bild übereinandergelegt. Im Kontrollansatz führt die Behandlung mit PDGF zur Ausbildung prominenter Aktinstrukturen in der Zellperipherie und auf der dorsalen Oberseite der

Zelle. Aus der Quantifizierung in Abbildung 3.36 (B) wird ersichtlich, dass mehr als 70 % der Zellen mit peripherem und etwa 50 % mit zirkulärem 'ruffling' auf PDGF-BB reagieren.

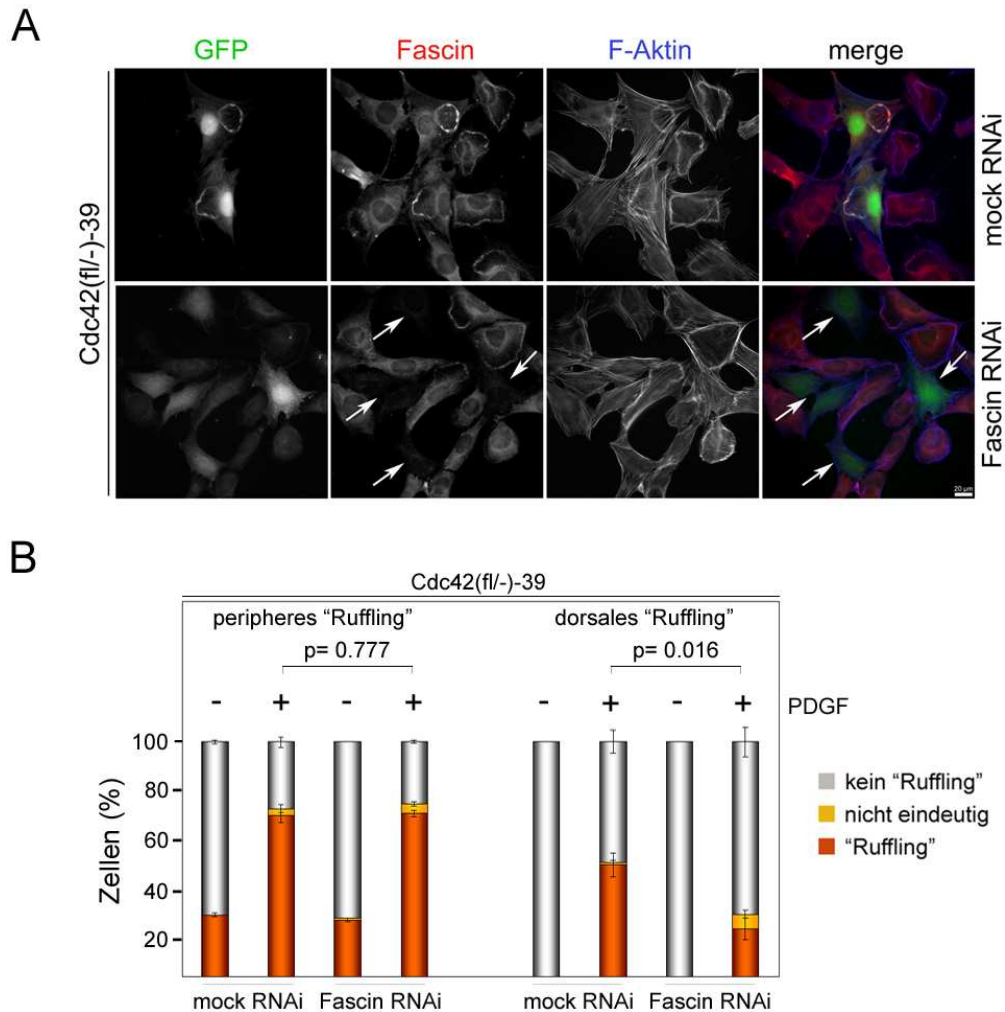


Abbildung 3.36: Fascin-‘knockdown’ reduziert PDGF-induzierte zirkuläre Aktinstrukturen.

In Kontrollzellen (*Cdc42 fl/-*) wurde durch Transfektion einer für Fascin-spezifischen shRNA die Expression von Fascin unterdrückt. In diesen Zellen wurde überprüft, inwiefern sich das auf die PDGF-vermittelte Aktinreorganisation auswirkt. Als Kontrolle wurde ein Kontrollplasmid (mock RNAi) verwendet. In beiden Fällen kodiert das Plasmid ebenfalls für das grün fluoreszierende Protein (GFP; in A linke Reihe). (A) Exemplarische Darstellung von Zellmorphologien. Die Pfeile deuten auf transfizierte Zellen hin, in denen ein erfolgreicher ‘knockdown’ von Fascin stattgefunden hat. (B) Die Quantifizierung erfolgte wie bereits in Abbildung 3.3 beschrieben.

Im Gegensatz dazu zeigt der Ansatz, in dem die Fascin-Expression transient mittels RNA-Interferenz herunterreguliert wurde, eine signifikante Hemmung des zirkulären dorsalen ‘ruffings’, nicht aber bei der peripheren Lamellipodienbildung. Die Pfeile in Abbildung 3.36 (A) im Fascin-RNAi Ansatz deuten auf Zellen, in denen die spezifische Fascin shRNA zu einem effizienten ‘knockdown’ geführt hat. Im merge-Bild ist klar ersichtlich, dass es in diesen Zellen zu einer Verminderung des dorsalen ‘ruffings’ kommt. Aus der Quantifizierung (B) geht hervor, dass das periphere ‘ruffling’

vergleichbar mit der Kontrolle zu etwa 70 % stimuliert werden kann; zirkuläre Aktinstrukturen sind in ihrer Bildung auf etwa 25 % reduziert.

Die transiente Unterdrückung der Fascin-Expression hat also keinen Einfluss auf PDGF-induzierte reguläre Lamellipodien, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Vignjevic et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind zirkuläre Aktinstrukturen durch die Abwesenheit von Fascin signifikant reduziert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von Fascin in diesem von PDGF-induzierten Signalweg hin.

3.12 Die Rolle von Mikrotubuli in PDGF-induziertem ‘ruffling’

Bei Mikrotubuli handelt es sich um dynamische röhrenartige Strukturen, aufgebaut aus Protofilamenten, die wiederum aus Tubulin- α/β -Heterodimeren bestehen. Sie sind neben Aktinfilamenten ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle. Sie sind u.a. für den intrazellulären Vesikel- und Organellentransport verantwortlich; des weiteren wurde bereits beschrieben, dass Mikrotubuli ebenso wie Aktin einen Einfluss auf die Motilität von Zellen bzw. auf die Lamellipodiebildung nehmen (Etienne-Manneville, 2004; Hu et al., 2002).

3.12.1 Nocodazol reduziert dorsales und stimuliert peripheres ‘ruffling’

Um die Rolle der Mikrotubuli in der PDGF-induzierten Signalkaskade eingehender zu untersuchen, wurden Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) mit Nocodazol behandelt, welches zur Depolymerisation von Mikrotubuli führt.

Die Zellen wurden für 16-18 h verhungert und im Anschluss entweder für 30 min mit Nocodazol in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/mL}$ oder mit DMSO als Kontrolle vorbehandelt. Nach PDGF-Stimulierung, Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung gegen α Tubulin und Aktinfärbung durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin, wurden periphere und dorsale zirkuläre ‘ruffles’ analysiert und quantifiziert. Aus Abbildung 3.37 (A: A) wird ersichtlich, dass es nach PDGF-Behandlung in Kontrollen zur Bildung peripherer bzw. zirkulärer ‘ruffles’ kommt. ‘Ruffles’ in der Peripherie werden zu etwa 80 %, ‘ruffles’ auf der dorsalen Oberseite der Zelle zu etwa 70 % stimuliert. In Abbildung 3.37 (A: A') ist das Mikrotubuli-Netzwerk durch Anfärben von α Tubulin, einer Untereinheit des Tubulin Heterodimers, deutlich zu sehen. Zudem ist in den zirkulären

Strukturen eine Kolokalisation von α Tubulin mit F-Aktin zu beobachten (Pfeil in A: A, A').

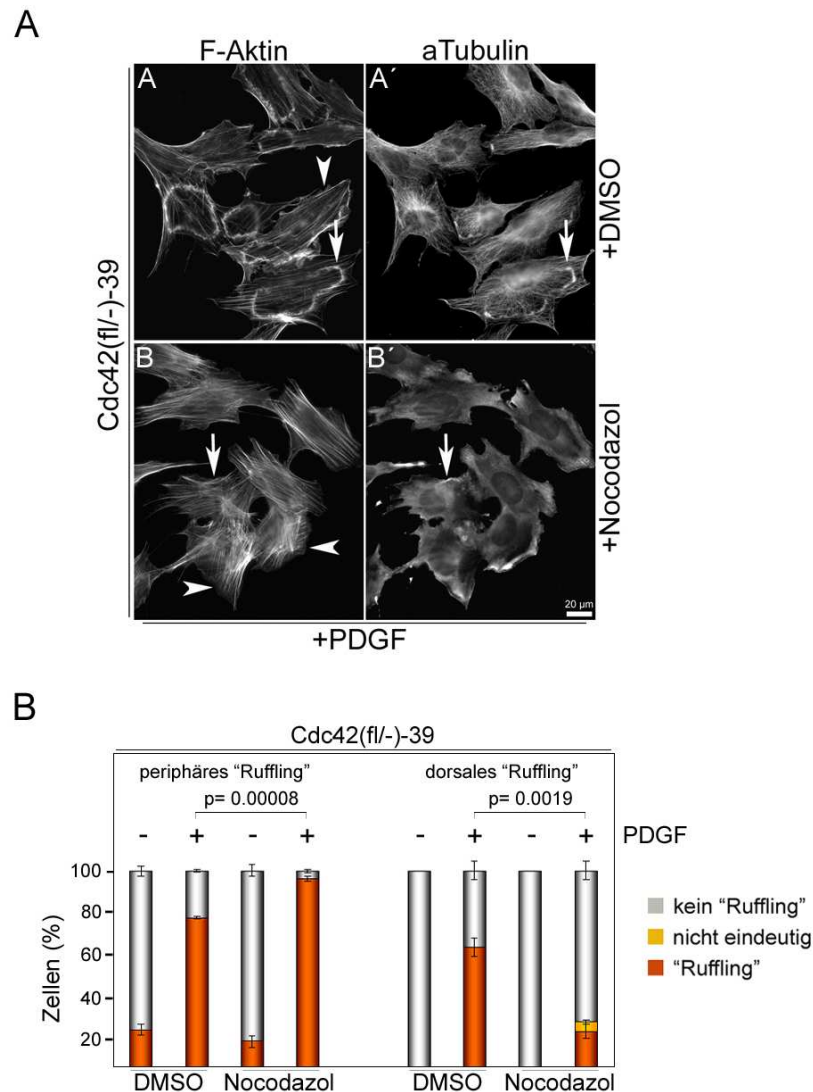


Abbildung 3.37: Die Depolymerisation von Mikrotubuli hat einen Einfluss auf PDGF-induziertes 'ruffling'.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) wurden zunächst auf Deckgläschen ausgesät und wie in Abbildung 3.3 beschrieben weiterprozessiert. Anstelle von LY294002 wurden die Zellen für 30 min mit Nocodazol (2 μ g/mL) behandelt und mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen α Tubulin gefärbt. (A: A, A') Kontrollbehandlung der Zellen mit DMSO; (A: B, B') Nocodazol-Behandlung; die Aufnahmen zeigen Zellen nach PDGF-Stimulierung. Die Pfeilspitzen weisen auf periphere, der Pfeil auf zirkuläre 'ruffles'. (B) Die Quantifizierung gibt die beobachteten Zellmorphologien (aus A) wieder. Für die Einstufung der einzelnen Zellmorphologien siehe Abbildung 3.3.

In Abbildung 3.37 A: B' ist ersichtlich, dass die Nocodazol-Behandlung zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli geführt hat. Im Vergleich zur Kontrolle ist hier kein organisiertes Netzwerk von Mikrotubuli mehr zu erkennen. Betrachtet man die Auswirkung der Aktivierung des PDGF-R durch PDGF-BB in den mit Nocodazol versetzten Zellen, so wird eine massive Reduktion der dorsalen 'ruffles' auf etwa 25 %

deutlich (s. Abbildung 3.37 A: B bzw. B), wohingegen das periphere 'ruffling' sogar mit annähernd 100 % signifikant stärker als in der Kontrolle ist. Dies stimmt mit bereits beschriebenen Daten in Bezug auf periphere Aktinformen überein (Mikhailov and Gundersen, 1998).

3.12.2 Lokalisation von α Tubulin in dorsalen 'ruffles'

Im oben beschriebenen Experiment (Abbildung 3.37 A: A, A` Pfeil) wurde beobachtet, dass α Tubulin in dorsalen zirkulären 'ruffles' mit F-Aktin und α Tubulin kolokalisiert. Um diese Beobachtung weiter zu verfolgen, wurden detaillierte α Tubulin-Lokalisationsstudien in PDGF-stimulierten Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) durchgeführt. Nach einer Verhungerungszeit von 16-18 h und sich anschließender PDGF-Behandlung, wurde α Tubulin durch den oben genannten spezifischen monoklonalen Antikörper angefärbt. Zusätzlich wurden Aktinfilamente mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt.

Betrachtet man die Tubulin-Färbung im peripheren Fokus der gezeigten Zelle in Abbildung 3.38, ist das Mikrotubuli-Netzwerk deutlich zu erkennen (Pfeilspitze). Jedoch kann aus der Aufnahme nicht eindeutig geschlossen werden, ob es zu einer Kolokalisation von F-Aktin und Tubulin im dorsalen 'ruffle' kommt. Bei Betrachtung der α Tubulin-Färbung im dorsalen Fokus wird deutlich, dass es sich um eine spezifische Kolokalisation der beiden angefärbten Zytoskelettkomponenten handelt (Pfeil).

Aufgrund der begrenzten Auflösung kann mit lichtmikroskopischen Methoden nicht geklärt werden, ob es sich im zirkulären 'ruffle' um eine Lokalisation von polymerisierten Mikrotubuli oder um Tubulindimere handelt. Weitere Experimente z.B. mit 'whole mount'-Zytoskettdarstellungen (Steffen et al., 2006) sind erforderlich um diese Entdeckung weiter zu charakterisieren.

Ob es an der Zellperipherie ebenfalls zu einer Kolokalisation beider Zytoskelettfilamenttypen kommt, geht aus Abbildung 3.38 nicht zweifelsfrei hervor. In Abbildung 3.39 wird dagegen deutlich, dass Mikrotubuli nicht bis in den vorderen Leitsaum des Lamellipodiums hineinreichen (s.u.).

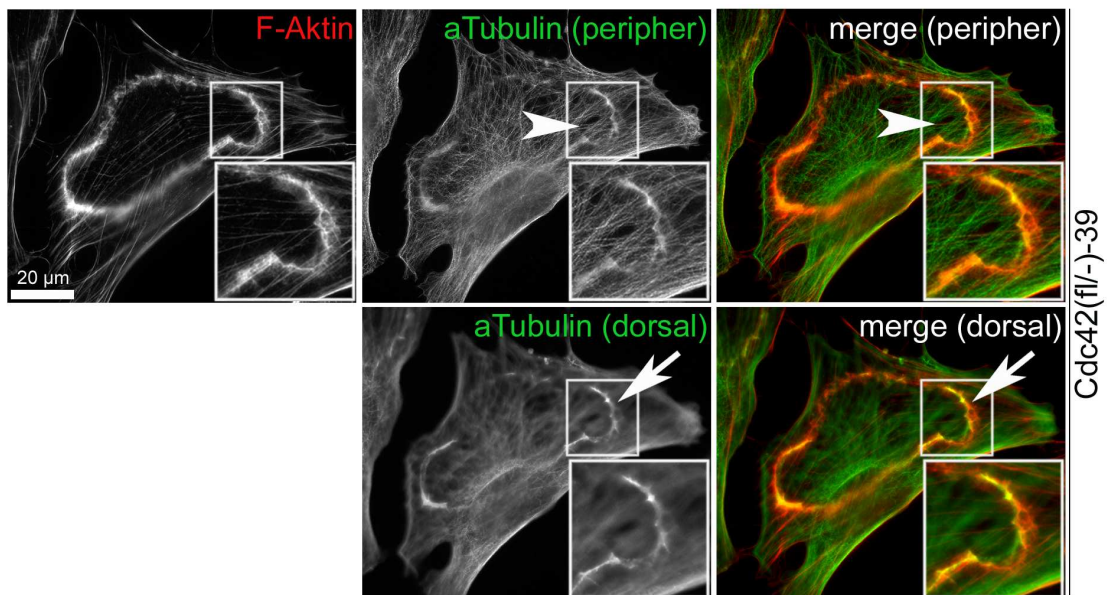


Abbildung 3.38: Lokalisierung von α Tubulin in zirkulären Aktinstrukturen.

Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-del) wurden auf Deckgläschen für 24 h kultiviert, anschließend 16-18 h verhungert und mit PDGF stimuliert (10 ng/mL). Es folgte Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung mit anti- α Tubulin und mit Phalloidin. Gezeigt ist die Tubulin-Färbung im peripheren und dorsalen Fokus der Zelle. Pfeile weisen auf zirkuläre 'ruffles' auf der dorsalen Oberfläche der Zelle hin, die Pfeilspitze deutet auf das Mikrotubuli-Netzwerk; dies wird in den vergrößerten Ausschnitten noch verdeutlicht.

3.12.3 WAVE2 lokalisiert in den durch Nocodazol stimulierten peripheren 'ruffles'

In den in Abschnitt 3.12.1 vorgestellten Daten konnte gezeigt werden, dass die durch Nocodazol vermittelte Depolymerisation der Mikrotubuli zu einer verminderten Ausbildung zirkulärer 'ruffles' nach Aktivierung des PDGF-R kommt. Im Gegensatz dazu führt der Verlust des Mikrotubuli-Netzwerkes zu erhöhtem peripheren Membran 'ruffling' durch PDGF-BB-Behandlung.

Da bereits in Abschnitt 3.7 gezeigt werden konnte, dass der WAVE-Komplex als Arp2/3-Komplex-Aktivator eine wichtige Rolle in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation spielt, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob es sich bei den durch Nocodazol-induzierten Aktinstrukturen tatsächlich um WAVE-Komplex-vermittelte Lamellipodien bzw. periphere 'ruffles' handelt. Dazu wurden Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) verhungert und im Anschluss mit PDGF stimuliert. Die Visualisierung der Mikrotubuli erfolgte durch einen monoklonalen Antikörper gegen α Tubulin, die des WAVE-Komplexes durch die Färbung von WAVE2 durch einen WAVE2-spezifischen polyklonalen Antikörper; das Aktinzytoskelett wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt.

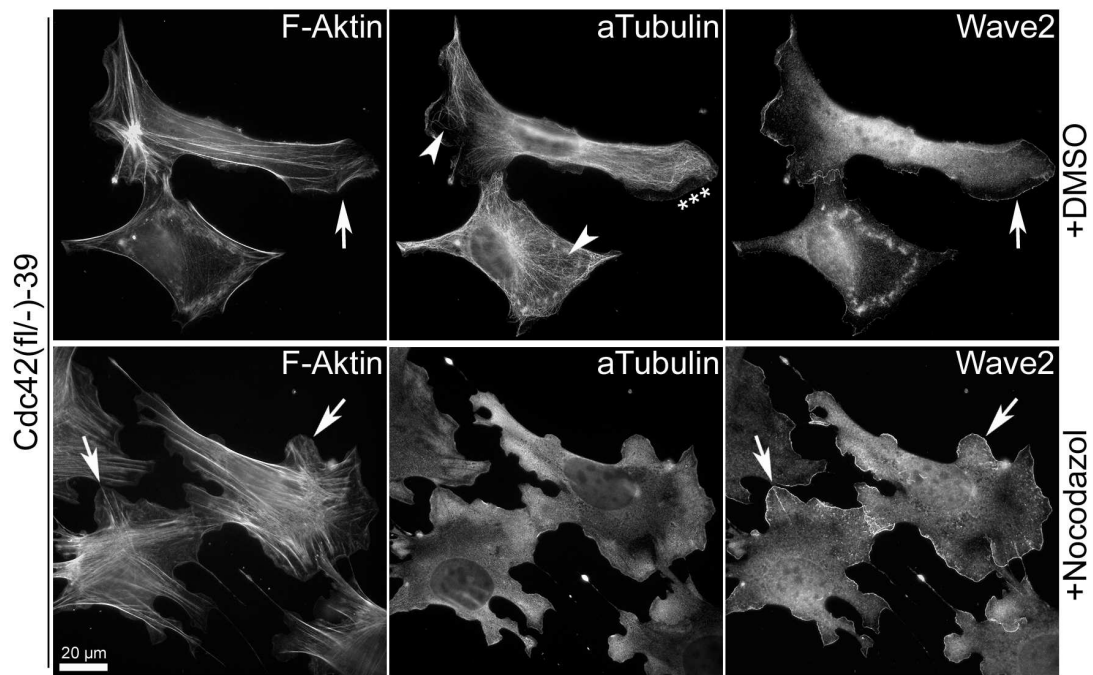


Abbildung 3.39: WAVE2 lokalisiert nach Depolymerisation der Mikrotubuli in peripheren Aktinstrukturen.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 24 h kultiviert, 16-18 h verhungert und mit PDGF stimuliert (10 ng/mL), anschließend fixiert und mit monoklonalem anti- α Tubulin, polyklonalem WAVE-Antikörper und Phalloidin gefärbt. Pfeile deuten auf Lamellipodien sowie die Lokalisierung von WAVE2 im vorderen Saum der Aktinstrukturen. Pfeilspitzen deuten auf das ausgeprägte Mikrotubuli-Netzwerk. Die Sterne heben hervor, dass einzelne Mikrotubuli nicht bis in das Lamellipodium hineinreichen.

Abbildung 3.39 zeigt, dass das periphere 'ruffling' nach PDGF-Stimulierung in den mit Nocodazol-behandelten Zellen prominenter in Erscheinung tritt als in Zellen mit intakten Mikrotubuli (s. Abbildung 3.39 Pfeile). In Kontrollzellen reicht zudem das Mikrotubuli-Netzwerk nicht bis in den vorderen Leitsaum des Lamellipodiums hinein (Sterne). Die WAVE2-Färbung ergibt, dass der WAVE-Komplex in beiden Ansätzen am vorderen Saum der peripheren Aktinstrukturen (und in Kontrollzellen auch in dorsalen zirkulären Strukturen) lokalisiert, so dass zusammenfassend gezeigt wird, dass es sich bei den durch Nocodazol-induzierten Strukturen um klassische WAVE-Komplex-vermittelte Lamellipodien handelt.

3.12.4 Rac-Aktivierung durch PDGF nach Nocodazol-Behandlung

Wie oben beschrieben (vergl. 3.12.1-3.12.3) wird durch Nocodazol-Behandlung das PDGF-induzierte periphere 'ruffling'/Lamellipodienbildung verstärkt, wohingegen zirkuläres 'ruffling' stark verringert ist. Da die WAVE-Färbung bestätigt, dass es sich um klassische Lamellipodien handelt, und da bekannt ist, dass diese von der GTPase Rac induziert werden (Eden et al., 2002; Ridley et al., 1992; Steffen et al., 2004) (vergl. auch Abschnitt 3.7), stellte sich die Frage, ob Nocodazol-Behandlung zu einer verstärkten Rac-Aktivierung führt.

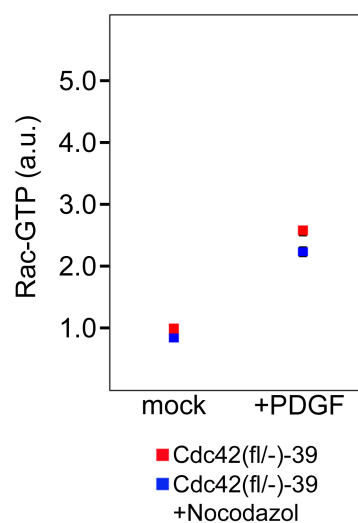


Abbildung 3.40: Geringfügige Reduktion der Rac-Aktivität in Nocodazol behandelten Zellen.

Mit Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurde wie in Abbildung 3.4 beschrieben verfahren. Anstelle von LY294002 wurde zur Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerks Nocodazol für 30 min in einer Konzentration von 2 µg/mL verwendet. Dargestellt ist die Rac-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Nocodazol und sich anschließender PDGF-Stimulation. Die Auswertung erfolgte analog zu der in Abbildung 3.4 beschrieben. Der p-Wert des Kontrollansatzes liegt bei 0.00003, der des Ansatzes mit Nocodazol bei 0.00016. Im Verhältnis der beiden Aktivierungswerte zueinander und zwar von 2.6 zu 2.2 ergibt sich ein p-Wert von 0.046.

Um näher zu untersuchen wie es sich mit der Aktivierung von Rac nach Stimulation des PDGF-R in Nocodazol-behandelten Zellen verhält, wurden Rac-Aktivierungsexperimente mithilfe der GLISA-Methode (s. 2.6.4) durchgeführt.

Abbildung 3.40 zeigt, dass die PDGF-Stimulierung in Fibroblasten (Cdc42 fl/-) zu einer deutlichen Aktivierung von Rac im Kontrollansatz führt (> 2.5-fach). In Nocodazol-behandelten Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild, obwohl die Rac-Aktivierung hier im Vergleich zum Kontrollansatz mit DMSO geringfügig, aber statistisch signifikant (p=

0.046; 2.2-fach) reduziert ist. Das verstärkte 'ruffling' in der Zellperipherie kann also nicht mit einer erhöhten Rac-Aktivität in Zusammenhang gebracht werden. Dies passt auch zu den Daten dieser Arbeit, in denen gezeigt wird, dass Rac-Aktivität für beides, peripheres und dorsal zirkuläres 'ruffling' erforderlich ist (Abschnitt 3.2).

3.13 Zirkuläres 'ruffling' in einer dreidimensionalen Collagen-Matrix

Werden Mausfibroblasten mit PDGF-BB stimuliert, kommt es zur Ausbildung zirkulärer Aktinstrukturen auf der dorsalen Oberfläche der Zelle (s. Abschnitt 3.1). Diese Strukturen werden mit den Prozessen der Rezeptorinternalisierung und Makropinozytose, in Verbindung gebracht. In Bezug auf den endozytischen Prozess der Makropinozytose konnte bereits in Abschnitt 3.4 dargestellt werden, dass Zellen, die einen Defekt in der Ausbildung dorsaler 'ruffles' aufweisen, ebenso eine verminderte Makropinozytoserate aufzeigen.

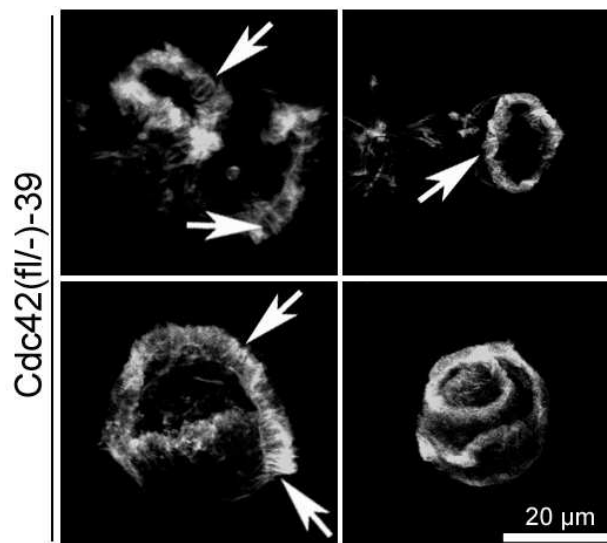


Abbildung 3.41: Zirkuläres 'ruffling' in einer 3D-Matrix.

Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) wurden in einer Collagen-Matrix ausgesät, 4 h verhungert und 10 min mit PDGF-BB (10 ng/mL) stimuliert. Das Aktinzytoskelett ist durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin angefärbt. Die Aufnahmen der Bilder erfolgte an einem konfokalen 'Laser Scanning'-Mikroskop unter Verwendung einer LD ('long distance') Linse. Die Pfeile weisen auf 'microspikes', die in zirkuläre 'ruffles' eingebettet sind.

Alle bisherigen Arbeiten zu dorsalem zirkulärem 'ruffling' wurden in zweidimensionaler Zellkultur durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die meisten Zytoskelettelemente auf eine flache Ebene projiziert werden, was für die meisten

mikroskopischen Techniken von großem Vorteil ist. Es wurde aber schon wiederholt angezweifelt, ob klassische Lamellipodien oder zirkuläre 'ruffles' in dieser Form überhaupt auftreten, wenn die Zelle von extrazellulärer Matrix umgeben ist. *In vivo* migrieren Zellen durch eine dreidimensionale Matrix, die reich an TypI Collagen ist. Um zu untersuchen ob sich zirkuläre 'ruffles' durch die Stimulation mit PDGF ebenso unter entsprechenden 3D-Bedingungen bilden, wurden Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) in eine Collagen-Matrix (Millipore) ausgesät. Nach einer Verhungerungszeit von 4 h, erfolgte die PDGF-Behandlung für 10 min. Die Zellen wurden im Anschluss fixiert und zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Bei den in Abbildung 3.41 dargestellten Aufnahmen handelt es sich um Rekonstruktionen konfokaler Ebenen. Zellen in Collagen-Matrix sind weniger ausgebreitet und kleiner als Zellen, die auf einer 2D-Oberfläche kultiviert wurden. Nichtsdestotrotz ist auch hier die Bildung von ausgeprägten zirkulären Aktinstrukturen mit zahlreichen eingebetteten 'microspikes' (Pfeile) die Zellantwort auf PDGF-BB-Stimulation.

4 Diskussion

Eukaryotische Zellen nutzen diverse hoch komplexe Signalkaskaden, mit einer Vielzahl an beteiligten Signalmolekülen um Aktindynamik und Zellform zu modulieren. Dadurch koordiniert die Zelle fundamentale zelluläre Prozesse wie z.B. die Morphogenese und die Zellmigration. Initiiert werden viele dieser Signalkaskaden über die Stimulierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) mit den entsprechenden Liganden. So kommt es u.a. durch die Behandlung von Zellen mit Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF, zu einer prominenten Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die zu verschiedenen aktinreichen Strukturen, wie Lamellipodien, Filopodien und 'microspikes' führt. Außerdem können sogenannte Membran 'ruffles' entweder in der Zellperipherie oder auf der dorsalen Oberseite der Plasmamembran, meist in zirkulärer Form, in Erscheinung treten. Da periphere 'ruffles' (Membranauffaltungen) aus sich vom Substrat abhebenden Lamellipodien hervorgehen, wird im Folgenden zwischen diesen beiden Strukturen nicht weiter differenziert (s. Abbildung 1.2; Abbildung 3.1) (Chinkers et al., 1979; Lanzetti et al., 2004; Mellstrom et al., 1988).

In der vorliegenden Dissertation sollten in murinen Fibroblasten die durch PDGF-BB-induzierten Signalkaskaden eingehender untersucht werden. Die detaillierte Charakterisierung der Signalwege ausgehend von der Plasmamembran bis zur Umstrukturierung von Aktinfilamenten in Form von peripheren bzw. zirkulären dorsalen Membranprotrusionen stand dabei im Vordergrund. Des weiteren sollte analysiert werden, ob sich diese speziellen Strukturen allein durch den Ort ihrer Entstehung oder auch in den molekularen Mechanismen unterscheiden, die zu ihrer Bildung führen.

4.1 Die Rolle der PI3-Kinase in PDGF-induzierten Signalkaskaden

Durch die Behandlung von Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB kommt es zur Aktivierung des PDGF β -Rezeptors, einer Rezeptortyrosinkinase. Bei Rezeptortyrosinkinasen handelt es sich um Transmembranproteine, die eine extrazelluläre ligandenbindende und eine zytoplasmatische Domäne, die wiederum eine Tyrosinkinasedomäne besitzt, aufweisen. Durch die Aktivierung der RTK kommt es zur Bindung verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle, wie z.B. der PI3-Kinase, die eine SH2-Domäne zur Bindung von phosphorylierten Tyrosinen aufzeigt (s. auch 1.4; 1.5.1).

Es wurde bereits beschrieben, dass die PI3-Kinase durch die Aktivierung des PDGF β -Rezeptors aktiviert wird, was wiederum zur Generierung von PIP₃ und infolgedessen zu einer Rekrutierung von PH-Domänen-besitzenden Signalmolekülen, wie der Akt Kinase oder verschiedener GEFs, an die Membran führt. Außerdem kommt es in Fibroblasten, in denen ein 'knockout' der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase durchgeführt wurde, zu einer Beeinträchtigung des PDGF-induzierten 'rufflings' (Brachmann et al., 2005; Hawkins et al., 1995; Wennstrom et al., 1994a; Wennstrom et al., 1994b).

Als einleitendes Experiment sollte daher die Rolle der PI3-Kinase in der PDGF-BB-induzierten Signalkaskade in Kontrollfibroblasten (Genotyp Cdc42 fl/del) durch die Verwendung von LY294002 und Wortmannin, zwei etablierter PI3-Kinase-Inhibitoren, eingehender untersucht werden; wobei PDGF in einer Konzentration von 10 ng/mL für 5 min verwendet wurde. Die Funktionalität beider Inhibitoren wurde anhand der Phosphorylierung von Akt (PKB) ermittelt (s. 3.3), welche sich in der Signalhierarchie unterhalb der PI3-Kinase befindet.

Durch die Stimulierung der Zellen mit PDGF kommt es zu einer deutlichen Reorganisation des Aktinzytoskeletts in embryonalen Mausfibroblasten (Mellstrom et al., 1988). In den hier verwendeten Kontrollfibroblasten tritt 'ruffling' in der Zellperipherie mit mehr als 90 % in Erscheinung, die Bildung zirkulärer 'ruffles' auf der dorsalen Seite der Zelle wird zu etwa 70 % induziert.

Die Inhibierung der PI3-Kinase durch den Einsatz von LY294002 bzw. Wortmannin hat den vollständigen Verlust zirkulärer Aktinstrukturen zur Folge, was Daten entspricht in denen gezeigt wurde, dass die PI3K eine wichtige Rolle in diesem Signalweg spielt (Brachmann et al., 2005; Lanzetti et al., 2004; Palamidessi et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist das periphere 'ruffling' zumindest teilweise PI3K-unabhängig: bei Verwendung von Wortmannin kommt es zu einer drastischen Reduktion der Bildung lamellipodialer Strukturen auf ca. 20 % Restaktivität, wohingegen sich LY294002-Behandlung nur schwach bzw. statistisch nicht signifikant auf PDGF-induziertes peripheres 'ruffling' auswirkt (von 90 % auf 80 %), was so mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Harper et al., 2007; Wennstrom et al., 1994a; Wennstrom et al., 1994b; Wymann and Arcaro, 1994).

Bei der Verwendung von Kinaseinhibitoren, die mit der ATP-Bindestelle der Kinase interferieren, ist generell zu beachten, dass eben diese Bindestellen innerhalb der Kinasen strukturell gut konserviert sind (Lindmo and Stenmark, 2006). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein vermeintlich spezifischer Inhibitor vor allem in höheren Konzentrationen auch andere Kinasen hemmt. So wurden sowohl für Wortmannin als auch für LY294002 weitere 'off-target'-Kinasen gefunden (Arcaro and

Wymann, 1993; Bonser et al., 1991; Brunn et al., 1996), wobei die aufgezeigten Nebeneffekte bei Wortmannin als weitaus drastischer beschrieben sind.

Da die Signalwege, die zur Bildung peripherer 'ruffles' führen, noch nicht vollständig aufgeklärt worden sind, bleibt unklar, welche entscheidende Komponente außer der PI3-Kinase durch den Einsatz von Wortmannin, aber nicht LY294002 inhibiert wird.

Es ist aber bekannt, dass etliche Signalmoleküle und auch Teile der aktinpolymerisierenden Maschinerie selbst durch noch wenig charakterisierte Kinasen phosphoryliert werden müssen, um ihre volle Aktivität zu erreichen. Dies gilt z.B. für die Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes ebenso wie für die des WAVE-Komplexes oder Rac selbst.

Allgemein etabliert ist dagegen die Tatsache, dass der kleinen RhoGTPase Rac eine entscheidende, wenn nicht essentielle Rolle in Signalkaskaden, die zur Bildung von Lamellipodien und Membran 'ruffles' führen, zugeschrieben wird. Außerdem wurde postuliert, dass es nach PDGF-Behandlung zu einer PI3-Kinase-abhängigen Aktivierung von Rac kommt (Hawkins et al., 1995; Lanzetti et al., 2004; Wennstrom et al., 1994a).

Daher wurde im nächsten Schritt ermittelt, ob die kleine GTPase Rac in den hier verwendeten Zellen nach PDGF-Stimulation abhängig oder unabhängig von PI3-Kinase aktiviert wird.

Aus den Rac-Aktivierungsexperimenten geht hervor, dass PDGF-BB in Kontrollzellen (Cdc42 fl/-) eine vierfache Rac-Aktivierung hervorruft, die durch den Einsatz von Wortmannin vollständig blockiert ist, was den Beobachtungen der PDGF-induzierten veränderten Zellmorphologien entspricht. Die Verwendung von LY294002 führt zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierbarkeit von Rac durch PDGF, jedoch verbleibt eine Restaktivität, die das PI3K-resistente 'ruffling' erklären kann. Der PI3-Kinase-unabhängige Aspekt der Rac-Aktivierung ist also offensichtlich ausreichend um peripheres, nicht aber dorsales zirkuläres 'ruffling' zu unterstützen. Dass Rac prinzipiell für beide Arten des 'rufflings' erforderlich ist, geht aus den Rac-RNAi Experimenten zweifelsfrei hervor (Abschnitt 3.6).

Zusätzlich zur PI3K-abhängigen Rac-Aktivierung wurden in der Literatur PI3K-unabhängige Signalwege, wie die Ras-abhängige Aktivierung von Rac, beschrieben (Lambert et al., 2002; Sun et al., 2003).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der PDGF-Rezeptor verschiedene Signalwege einschalten kann, die eventuell zur Ausbildung verschiedener Aktinstrukturen wie peripherer bzw. zirkulärer dorsaler 'ruffles' führen.

Weiterführende Experimente sind zum Verständnis der exakten Rolle der PI3-Kinase notwendig: durch die Verwendung der bereits erwähnten p85-‘knockout’-Zellen (Brachmann et al., 2005) würde eine weitere Möglichkeit bestehen den Einfluss der PI3-Kinase auf PDGF-induziertes Membran ‘ruffling’ zu untersuchen. Des weiteren könnte durch die ektopische Expression des PDGF β -Rezeptors, der Mutationen an den Tyrosinen 740 und 751 aufweist, den bekanntlichen Bindestellen der PI3K (Klippel et al., 1992; Wennstrom et al., 1994b), Effekte der PI3-Kinase im PDGF-BB-vermittelten Signalweg auf das Aktinzytoskelett näher untersucht werden. Die transiente Herunterregulation der PI3K-Expression mittels RNA-Interferenz (s. 2.7.11) bietet sich in diesem Fall nicht an, da sowohl die regulatorische als auch die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase in mehreren Isoformen auftritt (s. 1.5.1).

4.2 Akt als Effektor der PI3-Kinase

Bei der Akt Kinase (PKB) handelt es sich um ein Effektorprotein, das sich im Signalweg unterhalb der PI3-Kinase, auf die in Abschnitt 4.1 bereits ausführlicher eingegangen wurde, befindet. Die Aktivierung der PI3K z.B. durch Stimulierung der Zellen mit PDGF-BB führt zur Bildung des sekundären Botenstoffs PIP₃ in der Plasmamembran, was zur Rekrutierung der Akt Kinase über ihre PH-Domäne führt. Es erfolgt also eine PI3K-abhängige Translokation von Akt an die Membran, wo Akt durch eine weitere Kinase, PDK1, phosphoryliert und aktiviert wird (s. 1.6) (Franke et al., 1995; van Weering et al., 1998).

Um eine mögliche Funktion der Akt Kinase in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation als Effektor der PI3K näher zu untersuchen, wurden Kontrollfibroblasten mit einem Inhibitor behandelt, der jedoch die aktivierende Phosphorylierung der Akt Kinase blockiert. Dieser sogenannte Akt-Inhibitor hemmt also eine Proteinkinase, die sich im Signalweg zwischen der PI3-Kinase und Akt befindet, vermutlich die bereits erwähnte PDK1.

Die Wirkung wurde wie auch schon im Fall der PI3-Kinase-Inhibitoren über einen Nachweis der Akt-Phosphorylierung überwacht (s. 3.3); der Akt-Inhibitor wurde in einer Konzentration von 2.5 μ M eingesetzt.

Nach entsprechender Akt-Inhibitor-Vorbehandlung und anschließender PDGF-Stimulation werden keine zirkulären ‘ruffles’ mehr beobachtet, wohingegen peripheres ‘ruffling’ stark reduziert ist (auf ~ 40 %). Rac-Aktivierungsexperimente erwiesen, dass PDGF in Akt Kinase-Inhibitor behandelten Zellen zu keiner messbaren Rac-Aktivierung

führt. Außerdem wurde beobachtet, dass auch der basale Rac-Aktivitätspegel ohne PDGF-Induktion stark erniedrigt ist, was darauf hindeutet, dass der Akt-Inhibitor eine PDGF-unabhängige Beeinträchtigung der Rac-GTP-Level bewirkt.

Die Spezifität des Akt-Inhibitors ist noch nicht hinlänglich erforscht um unspezifische Effekte auszuschließen. Im Zusammenhang mit den PI3-Kinase-Experimenten lassen sich jedoch folgende Rückschlüsse ziehen: die PI3K ist für zirkuläres 'ruffling' essentiell, aber nur z.T. in die Rac-Aktivierung involviert. Da nach Akt-Inhibitor-Behandlung ein ähnlicher Phänotyp auftritt, kann geschlossen werden, dass das Produkt der PI3-Kinase, PIP_3 , nicht ausreichend ist um Rac-Aktivierung und Aktinreorganisation zu erklären. Aus den hier vorgestellten Experimenten kann die neue Einsicht gewonnen werden, dass auch die Proteinkinasekaskade, die durch die PI3-Kinase ausgelöst wird (PDK1, Akt usw.) für die Zellantwort auf PDGF erforderlich ist.

Um eine mögliche Funktion der Akt Kinase in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts weiter zu erhärten, wurde die subzelluläre Lokalisation nach PDGF-Stimulation durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen klar, dass Akt in peripheren und zirkulären 'ruffles' lokalisiert, was für Lamellipodien schon früher vorgeschlagen wurde (Higuchi et al., 2001).

Aufgrund der hier vorgestellten Daten wäre es möglich, dass die Akt Kinase eine jener oben erwähnten noch unbekannten Kinasen ist, die Teile der Aktin-Polymerisationsmaschinerie lokal phosphorylieren und somit voll aktivieren.

Die Rolle der Akt Kinase in Signalwegen der Wachstumsfaktor-induzierten Aktinreorganisation ist noch nicht verstanden. So wird beispielsweise kontrovers diskutiert, ob es sich bei den kleinen RhoGTPasen Rac und Cdc42 um Substrate der Akt Kinase handelt (Lawlor and Alessi, 2001), oder ob sie vielmehr zur Aktivierung der Akt Kinase beitragen können (Genot et al., 2000; Guo et al., 2006; Higuchi et al., 2001). Auch die Frage, ob es sich bei den drei beschriebenen Isoformen der Akt Kinase Akt1, Akt2 bzw. Akt3 um Proteine von funktioneller Redundanz handelt, konnte noch nicht eindeutig beantwortet werden (Gonzalez and McGraw, 2009). Weitere Experimente sind erforderlich um die Rolle dieser interessanten Kinase zu verstehen.

4.3 Charakterisierung der kleinen GTPase Cdc42

Die Aktivierung der PI3K z.B. über den PDGF β -Rezeptor führt zur Bildung von PIP_3 und der Membranrekrutierung von Signalmolekülen wie RhoGTPasen-spezifischen GEFs (s. 1.3.3.1; 1.5.1; 4.1) und in Konsequenz zur Aktivierung verschiedener RhoGTPasen wie Cdc42 und Rac.

Die kleine GTPase Cdc42 wurde anfänglich als essentielle Komponente in der Filopodienbildung beschrieben (Nobes and Hall, 1995), was jedoch zur Zeit wieder kontrovers diskutiert wird (Czuchra et al., 2005; Yang et al., 2006). Darüber hinaus wurde schon in der Vergangenheit beobachtet, dass Cdc42 einen Einfluss auf PDGF-induziertes zirkuläres, nicht aber peripheres 'ruffling' hat, was jedoch nicht detaillierter untersucht wurde (Yang et al., 2006).

Um die Rolle von Cdc42 in der PDGF-vermittelten Aktinreorganisation besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit Cdc42(fl/-)-39- und Cdc42-'knockout'-Zellen (Czuchra et al., 2005) verwendet. Durch die Stimulierung dieser Zellen mit PDGF-BB kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Form von ausgeprägten Lamellipodien und peripheren 'ruffles' sowohl in Cdc42(fl/-)- als auch in Cdc42(-/-)-Zellen. Außerdem induziert PDGF in mehr als 70 % der Kontrollfibroblasten (#39) die Ausbildung zirkulärer Aktinstrukturen, die in Cdc42-defizienten Zellen mit weniger als 10 % stark reduziert in Erscheinung treten (s. Abbildung 3.13). Diese Beobachtungen lassen auf eine entscheidende Rolle von Cdc42 in der durch PDGF-induzierten Signalkaskade, die zur Bildung dorsaler 'ruffles', nicht aber peripherer Aktinstrukturen führt, schließen.

Da zirkuläres Membran 'ruffling' in den endozytischen Prozess der Makropinozytose involviert sein soll (Buccione et al., 2004; Dowrick et al., 1993) (s. 1.7.1), wurde überprüft, ob die makropinozytische Aufnahme von dem Flüssigphasenmarker Dextran in Abwesenheit von Cdc42 beeinträchtigt ist. Dazu wurden Cdc42(fl/-)- und -'knockout'-Zellen unter Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Dextran mit PDGF stimuliert. Es stellte sich heraus, dass Cdc42(-/-)-Zellen tatsächlich in ihrer Fähigkeit Makropinozytose zu betreiben drastisch eingeschränkt sind. Die makropinozytische Aufnahme von Dextran ist im Vergleich zu Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/del) auf etwa 50 % reduziert. Die Daten bestätigen also die Beteiligung dorsaler 'ruffles' am endozytischen Signalweg der Makropinozytose, bestätigen aber auch die Existenz alternativer Routen z.B. über peripheres 'ruffling' (Marsh, 2001), da die Makropinozytose um 50 %, zirkuläres 'ruffling' aber um 85 % reduziert ist.

Eine Absicherung, dass das Fehlen von Cdc42-Aktivität der Grund für das reduzierte zirkuläre 'ruffling' und der verringerten Makropinozytose-Rate in Cdc42-'knockout'-Zellen ist, ergibt sich aus dem Experiment, welches bestätigt, dass PDGF-BB-Stimulation in Kontrollzellen tatsächlich zu einer signifikanten Cdc42-Aktivierung führt. Während also Rac-Aktivität für die Ausbildung von sowohl Lamellipodien als auch dorsalen zirkulären 'ruffles' erforderlich ist, so ist Cdc42-Aktivität zusätzlich zur Rac-Aktivität nur für die Bildung zirkulärer 'ruffles' wichtig. Dazu passen auch die Resultate der Rac-Messungen in Cdc42-KO-Zellen, die eine Rolle von Cdc42 in der Rac-Aktivierung für diesen Signalweg ausschließt. Andere Signalwege in denselben Zellen,

wie z.B. HGF-Stimulation des c-Met Rezeptors, brauchen Cdc42-Aktivität um volle Rac-Aktivierung zu erreichen (Bosse et al., 2007).

4.3.1 N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42

N-WASP ist nicht nur ein wichtiger Effektor von Cdc42 in der Aktinreorganisation (Symons et al., 1996); es wurde auch schon mehrfach in die Endozytose von Rezeptortyrosinkinasen impliziert (Benesch et al., 2005; Innocenti et al., 2005). Im scheinbaren Einklang damit wurde in der Literatur schon beschrieben, dass N-WASP wichtig für die Bildung zirkulärer 'ruffles' ist (Legg et al., 2007). Um die mögliche Rolle von N-WASP für PDGF-BB-induzierte Aktinreorganisation näher zu untersuchen, wurden zwei unabhängige N-WASP-'knockout'-Zelllinien verwendet (Lommel et al., 2001; Snapper et al., 2001), sowie N-WASP-RNA-Interferenz in denselben oben bereits erwähnten Kontrollfibroblasten (Cdc42 fl/-) durchgeführt. Nicht zuletzt wurde die subzelluläre Lokalisation von N-WASP in PDGF stimulierten Zellen mit Hilfe von Antikörperfärbungen und eines GFP-N-WASP-Konstruktes untersucht.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass N-WASP in Fibroblasten keine entscheidende Komponente des Signalweges ist, der zur Bildung der dorsalen 'ruffles' führt. Weder lokalisiert N-WASP in Fibroblasten in diesen Strukturen, noch hat ein Fehlen von N-WASP eine Auswirkung auf die Frequenz der Bildung oder das Endergebnis, nämlich die Bildung makropinozytischer Vesikel.

4.3.2 WAVE-Komplex-vermittelte Bildung peripherer und zirkulärer 'ruffles'

Rac ist maßgeblich an der Regulation der WAVE-Komplex-vermittelten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes beteiligt (Stradal et al., 2004), die eine entscheidende Rolle in der Bildung lamellipodiale Aktinstrukturen und peripherer 'ruffles' spielt (Steffen et al., 2004). Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Rolle des WAVE-Komplexes auch für zirkuläres dorsales 'ruffling' bestätigt werden, was in Übereinstimmung mit der Rolle von Rac ist. WAVE-Komplex-Komponenten wie WAVE2 und Abi1 bzw. Eps8, als Interaktionspartner von Abi1, lokalisieren konsequenterweise in peripheren und zirkulären 'ruffles'.

In Einklang damit führt der transiente 'knockdown' der WAVE-Komplex-Komponente Nap1, der zu einer Herunterregulation der übrigen Untereinheiten wie WAVE und Abi

führt (Blagg et al., 2003; Rogers et al., 2003; Steffen et al., 2006; Steffen et al., 2004), zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Zellen Membran 'ruffles' bilden zu können (s. Abbildung 3.25). Damit gleicht das Ergebnis dem Phänotyp, der nach einem Rac1- 'knockdown' zu beobachten ist und lässt darauf schließen, dass sowohl periphere Protrusionen als auch zirkuläre dorsale 'ruffles' nach PDGF-Stimulation der Zellen abhängig von WAVE-Komplex-vermittelter Arp2/3-Komplex-induzierter Aktinreorganisation sind.

Suetsugu und Kollegen (Suetsugu et al., 2003) schlugen vor, dass eine differenzielle Lokalisation von WAVE1 und WAVE2 in zirkulären und peripheren Aktinstrukturen auf eine Aufgabenteilung der beiden Arp2/3-Komplex-Aktivatoren hindeutet. Des Weiteren postulierten sie, dass Wave1 essentiell für zirkuläre und Wave2 essentiell für periphere 'ruffles' ist, was jedoch im folgenden in Publikationen (Legg et al., 2007) und im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (nicht gezeigte Daten). Eine prominente Rolle von WAVE2 in der Bildung von zirkulären 'ruffles' und beim Vorgang der Makropinozytose wurde außerdem in unabhängigen Studien beschrieben (Sun et al., 2003; Yan et al., 2003)

Nicht zuletzt wird die Rolle des WAVE-Komplexes bei der Bildung zirkulärer dorsaler 'ruffles' durch die Resultate unter Verwendung von Abi1-'knockout'-Zellen aus der vorliegenden Arbeit gestützt. Abi Proteine sind eine essentielle Komponente des WAVE-Komplexes und sind im Säuger durch drei Isoformen vertreten: Abi1, Abi2 und Abi3 (Nesh) (Hirao et al., 2006). Abi1 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression von Abi2 verstärkt in neuronalen Geweben und die von Nesh in der Milz auftritt (Grove et al., 2004; Hirao et al., 2006). Ob es sich bei den Abi-Isoformen um Proteine mit redundanter Funktion handelt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Dagegen spricht jedoch, dass z.B. für Abi1 und Abi2 beschrieben worden ist, dass sie die Phosphorylierung der Kinase Abl fördern, Nesh dazu aber nicht in der Lage ist (Hirao et al., 2006). Dafür spricht, dass Mäuse, in denen ein genetischer 'knockout' von Abi2 durchgeführt wurde, nur Defekte im Auge und subtile Veränderungen an manchen Nerven aufweisen, aber alle anderen, auch neuronalen, Gewebe durch kompensatorische Expression von Abi1 ohne Phänotyp bleiben (Grove et al., 2004). Der genetische 'knockout' von Abi1 in Mäusen ist dagegen früh embryonal lethal (unpublizierte Daten der Kooperationspartner des NYBC).

In der vorliegenden Arbeit wurden in enger Kooperation mit Dr. Leszek Kotula vom NYBC (New York Blood Center) Abi1-'knockout'-MEFs ('mouse embryonic fibroblasts') und entsprechende Abi1-Kontrollzelllinien etabliert (s. Kapitel 3.8).

Das Fehlen von Abi1 führt in KO-Zellen zu einer Herunterregulation der übrigen untersuchten Komponenten des WAVE-Komplexes (s. Abbildung 3.27). Gleichzeitig wird eine verstärkte, wahrscheinlich kompensatorische Expression von Abi2 beobachtet, die jedoch nicht zu einer vollständigen Rettung des WAVE-Komplexes führt, wohl aber die Restaktivität erklären kann. Dafür würden Daten aus einem genetischen Nap1-‘knockout’ sprechen, die ein totales Verschwinden des WAVE-Komplexes in Nap1-KO-Zellen beschreiben (Rakeman and Anderson, 2006). Das Fehlen von Nap1 kann von seinem Paralog Hem1 nicht kompensiert werden, da dessen Expression strikt hämatopoetisch ist (Park et al., 2008).

Da Abi1 nicht nur als Bestandteil des WAVE-Komplexes wichtige Funktionen übernimmt, sondern z.B. direkt mit der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase interagiert und diese dann zur vollständigen Aktivierung des trimeren RacGEF-Komplexes bestehend aus Abi1, Eps8 und Sos1, beiträgt (Innocenti et al., 2003; Scita et al., 2001), muss in weiterführenden Experimenten überprüft werden, ob Abi2 ebenfalls in der Lage ist, die regulatorische Untereinheit p85 zu rekrutieren und damit den RacGEF-Komplex zu stabilisieren, oder ob der Abi1-‘knockout’ sich in irgend einer Form auf die Rac-Aktivierbarkeit im PDGF-BB-Signalweg auswirkt.

In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass Abi1 direkt mit N-WASP interagieren und es aktivieren kann (Innocenti et al., 2005). Da in diesem Zusammenhang eine Rolle von Abi1 in endozytischen Prozessen beobachtet wurde, muss u.a. kontrolliert werden, ob Abi1-KO-Zellen bezüglich der Clathrin-vermittelten Aufnahme von Substanzen wie Transferrin bzw. der Rezeptor-vermittelten Internalisierung von EGF oder PDGF beeinträchtigt sind.

4.4 Filopodien und ‘microspikes’ als Teil zirkulärer ‘ruffles’

Die Morphologie dorsaler aktinreicher Strukturen wurde vom Zeitpunkt des Erscheinens, etwa 2-5 min nach PDGF-Zugabe, bis zum Zusammenziehen bzw. Schließen des ‘ruffles’, etwa 12-15 min nach PDGF-Zugabe, durch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen detaillierter untersucht.

Im Verlauf der Bildung und Reifung zirkulärer ‘ruffles’ ist zu beobachten, dass sie sich erheben und zusammenziehen. Mit fortlaufender Konstriktion verschmelzen die Membranschichten, so dass sie letztlich mit dem vollständigen Schließen des ‘ruffles’ von der Oberfläche der Zelle verschwinden und sich dabei Vesikel bilden (s. Abbildung 3.30). Zudem fallen segelartige Strukturen auf (s. Abbildung 3.30 Pfeil), die möglicherweise stabilisierende Funktionen übernehmen, damit der ‘ruffle’ sich dorsal in

das Medium erheben kann. Nicht zuletzt sind Filopodien und auch 'microspikes' in die dorsalen Strukturen eingebettet (s. Abbildung 3.30-2; Abbildung 3.31), was auch durch die nähere Untersuchung von Markerproteinen dieser aktinreichen Strukturen wie Fascin, VASP und MyosinX bestätigt wird (s. Abbildung 3.32; Abbildung 3.33; Abbildung 3.34).

Die Unterdrückung der Fascin-Expression mit RNA-Interferenz führt zum Verlust von 'microspikes' bzw. Filopodien in B16 Melanomzellen, wirkt sich aber nicht auf Lamellipodien aus (Vignjevic et al., 2006). Dies ist in zirkulären dorsalen 'ruffles' überraschenderweise anders: in der vorgelegten Arbeit konnte durch einen RNAi-vermittelten 'knockdown' von Fascin das PDGF-induzierte zirkuläre 'ruffling' stark beeinträchtigt werden, wohingegen die Bildung peripherer Aktinstrukturen, wie bereits beschrieben wurde, nicht verringert ist (s. Abbildung 3.36). 'Microspikes' bzw. Filopodien spielen also, anders als an der Zellperipherie, eine entscheidende Rolle bei der Bildung dorsaler 'ruffles'. Denkbar wäre eine stabilisierende Funktion von 'microspikes' und Filopodien, wenn die Membranfalten sich über die Membranoberfläche hinaus erheben. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang auch wieder der Cdc42-KO-Phänotyp. Weder die Rac-Aktivierung im PDGF-Signalweg, noch der Effektor N-WASP konnten verantwortlich für die Rolle von Cdc42 gemacht werden. Somit bleibt als attraktive Möglichkeit offen, dass Cdc42-Aktivität gebraucht wird um Filopodien zu induzieren, die die Protrusion in die dritte Dimension stabilisieren. Obwohl Cdc42 nach neueren Erkenntnissen nicht essentiell für Filopodienbildung ist (Czuchra et al., 2005), so ist es doch einer der stärksten und am besten charakterisierten Induktoren dieser Strukturen (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995; Steffen et al., 2006).

Die Bildung von 'microspikes' bzw. Filopodien verläuft Arp2/3-Komplex-unabhängig (Steffen et al., 2006), involviert aber wahrscheinlich Aktinnukleatoren der Formin-Familie, die durch verschiedene RhoGTPasen induziert, zur Filopodienbildung führt (Faix et al., 2009; Faix and Rottner, 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei mDia2/Drf3 u.a. um einen Cdc42-Effektor in der Filopodienbildung handelt (Pellegrin and Mellor, 2005; Peng et al., 2003). Ob mDia2 oder andere Formine in der PDGF-induzierten Signalkaskade als Effektoren von Cdc42 eine Rolle spielen und möglicherweise somit entscheidend für die Ausbildung zirkulärer Aktinstrukturen sind, ist noch offen.

Die Rolle von Fascin im Speziellen und von Filopodien im Allgemeinen in der PDGF-induzierten Bildung zirkulärer 'ruffles' muss also in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.5 Mikrotubuli in der PDGF-induzierten Aktinreorganisation

Das Aktinzytoskelett ist nur eine der drei Komponenten des Zytoskeletts der eukaryotischen Zelle. So wurde bereits beschrieben, dass die Stimulierung des PDGF β -Rezeptors durch PDGF-BB ebenfalls eine PI3-Kinase-abhängige Reorganisation von Vimentin, einer Klasse der Intermediärfilamente, zur Folge hat (Valgeirsdottir et al., 1998).

Die dritte Komponente des Zytoskeletts ist das Mikrotubuli-System. Mikrotubuli spielen nicht nur eine Rolle im intrazellulären Stofftransport und bei der Zellteilung, ihnen wurden auch vielfältige Rollen bei der GTPasen-Regulation zugeschrieben (Glaven et al., 1999; Krendel et al., 2002; Lim et al., 2008; Mikhailov and Gundersen, 1998; Ren et al., 1998; Wittmann and Waterman-Storer, 2001) und sogar ein direkter Einfluss auf Protrusion und Migration (Etienne-Manneville, 2004; Etienne-Manneville and Hall, 2003). Die vorliegende Studie ergab, dass ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk unabdingbar für effizientes zirkuläres 'ruffling' ist. Mit Nocodazol behandelte Zellen, in denen Mikrotubuli depolymerisiert sind, zeigen nicht nur den bekannten Polaritätsverlust und ein ungerichtetes 'ruffling', mit der Bildung großer Lamellipodien (Goldman, 1971; Mikhailov and Gundersen, 1998; Vasiliev, 1991; Vasiliev et al., 1970), sondern sind auch stark beeinträchtigt in der Bildung zirkulärer dorsaler 'ruffles'.

In Immunfluoreszenzen mit gegen α Tubulin-gerichteten Antikörpern kann nicht geklärt werden, ob es sich bei der Färbung um Mikrotubuli oder um Tubulindimere handelt. Die Färbung von acetyliertem Tubulin könnte in diesem Zusammenhang einen Hinweis geben, da acetyliertes Tubulin nur in bereits länger bestehenden Filamenten auftritt (Wolf and Böhm, 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre eine elektronenmikroskopische Analyse der Zytoskelettpolymere in dorsalen 'ruffles'.

Die nach Mikrotubuli-Depolymerisation und anschließender PDGF-Stimulierung verstärkte Bildung von Lamellipodien konnte nicht eindeutig auf einen Einfluss auf generelle Rac-Aktivierung zurückgeführt werden (s. Abbildung 3.40).

Diese Daten deuten also einmal mehr darauf hin, dass es zwei unabhängige Signalwege geben könnte, die das periphere bzw. das zirkuläre 'ruffling' steuern, obwohl sich die durch PDGF-induzierten Aktinstrukturen prinzipiell sehr ähnlich sind.

Wie jedoch die Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerkes zur einer Reduktion dorsaler 'ruffles' führt, muss in weiterführenden Experimenten eingehender untersucht werden. So könnte z.B. die makropinozytische Aufnahme von Dextran nach Nocodazol-Behandlung kontrolliert werden, da bereits vermutet wurde, dass Makropinozytose ein Mikrotubuli- und Aktin-abhängiger Prozess ist (Watts and Marsh, 1992).

Ferner wurde beschrieben, dass Mikrotubuli mit Filopodien bzw. 'microspikes' assoziiert sind (Schober et al., 2007), so dass Mikrotubuli zusammen mit diesen aktinreichen Strukturen eine mögliche Funktion in der Stabilisierung PDGF-induzierter zirkulärer 'ruffles' übernehmen könnten. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Frage, welche Auswirkung die Behandlung der Zellen mit Taxol und anschließender PDGF-Stimulation hat, da es sich bei Taxol im Gegensatz zu Nocodazol um ein Mikrotubuli-stabilisierendes Reagenz handelt.

Eine weitere Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und dem Mikrotubuli-Netzwerk könnte das Protein IQGAP herstellen, welches sowohl an die RhoGTPasen Rac und Cdc42 als auch an CLIP170 binden kann (Brandt and Grosse, 2007; Fukata et al., 2002). IQGAP wurde eine wichtige Rolle im Transport von Forminen an die sich vorschiebende Zellfront zugeschrieben (Brandt et al., 2007). EB1, ein Protein, das wie CLIP170 an die (+)-Enden von Mikrotubuli bindet, kann mit dem Formin mDia2, einem Effektor in der Filopodienbildung, interagieren (Schirenbeck et al., 2005; Wen et al., 2004). In Abschnitt 4.4 wurde bereits auf eine mögliche Relevanz der Formine im PDGF-induzierten dorsalen Membran 'ruffling' eingegangen.

4.6 Zirkuläre 'ruffles' in der 3. Dimension

Die Bildung dorsaler 'ruffles' nach PDGF-Stimulierung wird u.a. in Fibroblasten und Epithelzellen beobachtet, die auf zweidimensionalen Oberflächen kultiviert werden.

Auch viele Krebszellen zeigen sowohl peripheres als auch dorsales 'ruffling', was direkt mit einer erhöhten Tumoraktivität bzw. Tumoraggressivität sowie mit einer verstärkten Metastasierung korreliert. Ferner wird vor allem zirkuläres 'ruffling' mit dem Vorgang der Rezeptorinternalisierung und mit dem endozytischen Prozess der Makropinozytose in Verbindung gebracht. Trotz allem wurde die physiologische Relevanz zirkulärer 'ruffles' häufig in Frage gestellt, da der Nachweis der Existenz dieser aktinreichen Strukturen unter physiologischen Bedingungen noch nicht erfolgt ist (Dowrick et al., 1993; Jiang et al., 1995; Koivusalo et al.; Orth and McNiven, 2006).

In vivo migrieren Zellen durch eine dreidimensionale Matrix, die reich an Collagen Typ1 ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass auch in der 3D-Matrix, Zellen, die eine völlig andere, weniger ausgebreitete, eher runde Morphologie aufweisen, nach PDGF-Stimulation genauso prominente zirkuläre 'ruffles' bilden (s. Abschnitt 3.10). Auch diese beinhalten zahlreiche 'microspikes' (s. Abbildung 3.41). In weiterführenden Experimenten muss geklärt werden, ob die mechanischen und

signalabhängigen Bedürfnisse dieser 'ruffles' die Daten aus der 2D-Zellkultur widerspiegeln.

Es wurde bereits beschrieben, dass in vielen Krebsarten die Expression u.a. der Akt Kinase sowie von Fascin hochreguliert ist, so dass z.B. der Expressionsgrad von Fascin als potentieller Marker für Krebs diskutiert wird (Bakshi et al., 2007; Kostopoulou et al., 2008; Zhang et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Akt als auch Fascin entscheidende Rollen bei der PDGF-induzierten Aktinreorganisation spielen. Eine detaillierte Untersuchung der Signalkaskade bzw. der molekularen Mechanismen, die zur Bildung zirkulärer 'ruffles' führen, wäre somit auch für die Krebsforschung relevant.

4.7 Perspektiven und ergänzende Anmerkungen

In der vorliegenden Dissertation erfolgte die eingehende Charakterisierung des PDGF-induzierten Membran 'ruffings', wobei die detaillierte Untersuchung der potentiell unterschiedlichen Signalkaskaden, die zur Ausbildung peripherer Membranprotrusionen bzw. zirkulärer 'ruffles' auf der dorsalen Zelloberseite führen, im Vordergrund stand. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 5 zusammengefasst.

Dabei wurde nur auf ausgewählte Aspekte, die im Zusammenhang mit der PDGF-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts stehen, näher eingegangen.

Die Aktivierung des PDGF β -Rezeptors wird durch die verschiedenen Dimere des Wachstumsfaktors PDGF-AB, -BB und -DD stimuliert. Für die Behandlung der Zellen mit PDGF-AB und PDGF-BB konnte gezeigt werden, dass sie einen Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts nehmen, jedoch ist der Grad der Ausprägung des 'ruffings' abhängig vom verwendeten PDGF-Dimer (s. 1.4.1), wobei PDGF-BB die Bildung prominenterer Strukturen herhorruft. Allein dies deutet darauf hin, dass der PDGF β -Rezeptor verschiedene Signalwege bedienen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde nur PDGF-BB betrachtet.

Ein interessanter Punkt, der experimentell nicht behandelt werden konnte, ist die Beobachtung, dass die Inhibierung des RhoGGEFs TrioN durch IXT3 eine reduzierte Ausbildung zirkulärer 'ruffles' zur Folge hat, wohingegen peripheres 'ruffling' stärker stimuliert wird (Bouquier et al., 2009). Dies ist nur ein weiterer Hinweis auf die Existenz von zwei verschiedenen Signalwegen, die verantwortlich für die Bildung peripherer bzw. dorsaler 'ruffles' sind. RhoG kann Rac-Aktivierung induzieren, was bedeuten könnte, dass es unterschiedliche Quellen und somit Qualitäten der Rac-Aktivität gibt, die zur Bildung verschiedener Strukturen führen könnten. Die Regulation von spezifischen GTPasen-Regulatoren könnte also maßgeblich daran beteiligt sein,

welcher der beiden Signalwege stimuliert wird. Z.B. beeinträchtigt der genetische Doppel-'knockout' von G_{12}/G_{13} , zweier G-Proteine, die an der Modulation der Aktindynamik beteiligt sind, nicht die Bildung PDGF-induzierter dorsaler 'ruffles', aber deren Lebensdauer, was vermutlich mit der Aktivierungsdauer und dem Aktivierungsgrad von Rac korreliert (Wang et al., 2006).

In allen vorangegangenen Punkten steht vor allem die Rolle der kleinen RhoGTPasen Rac und Cdc42 in der PDGF-induzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts im Vordergrund. Hinzufügend soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch andere Mitglieder der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen, wie z.B. Rab5, Rab34, Rab35 sowie für Arf6 wichtige Funktionen in der PDGF-vermittelten Bildung vor allem von zirkulären 'ruffles' haben (Jackson et al., 2000; Lanzetti et al., 2004; Palamidessi et al., 2008; Randazzo et al., 2000; Shim et al.; Sun et al., 2003).

Die Regulation der involvierten Signalkaskaden, die die verschiedenen aktinreichen Protrusionen stimulieren, ist also sehr komplex. Ein komplettes Verständnis des Zusammenspiels von Signalweiterleitung und Aktinreorganisation ist noch weit entfernt.

.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation sollte die durch PDGF-BB-induzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts näher charakterisiert werden. Die Stimulierung der Zellen mit PDGF führt zur Ausbildung prominenter Membran 'ruffles', wobei Protrusionen in der Zellperipherie von denen unterschieden werden, die auf der dorsalen Plasmamembran der Zelle in Erscheinung treten und meist eine zirkuläre Morphologie aufweisen.

Die Hemmung der PI3-Kinase sowie der Akt Kinase zeigen vergleichbare Phänotypen. Die Inhibition der Kinasen führt zu einem vollständigen Verlust zirkulärer nicht aber peripherer 'ruffles'. So handelt es sich bei den genannten Kinasen um essentielle Komponenten in der Bildung zirkulärer 'ruffles'. Die Bildung peripherer 'ruffles' erfolgt dagegen zumindest z.T. auch PI3K- bzw. Akt Kinase-unabhängig.

Cdc42-defiziente Zellen sind in ihrer Fähigkeit periphere 'ruffles' zu bilden nicht beeinträchtigt, wohingegen es zu einer massiven Reduktion der Bildung zirkulärer Aktinstrukturen kommt, was mit einer verminderten Makropinozytoserate in Cdc42-KO-Zellen korreliert. Da PDGF-BB Cdc42 aktiviert, kann geschlossen werden, dass Cdc42 eine wichtige Rolle für zirkuläre 'ruffles', nicht aber für peripheres 'ruffling' spielt.

Eine Rolle von N-WASP als direkter Interaktionspartner von Cdc42 in Fibroblasten kann ausgeschlossen werden. Dagegen konnte gezeigt werden, dass beide Formen des PDGF-induzierten 'rufflings' abhängig von der WAVE-Komplex-vermittelten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes sind. Ferner wird Rac für die Bildung peripherer sowie dorsaler Aktinstrukturen benötigt, wobei die Rac-Aktivierung durch den PDGF β -Rezeptor Cdc42-unabhängig verläuft. Diese Beobachtungen implizieren, dass zwei Signalkaskaden existieren, die zu 'ruffles' in der Zellperipherie bzw. auf der dorsalen Oberseite der Zelle führen, wobei sowohl Rac als auch Cdc42 für zirkuläres 'ruffling' entscheidend sind, jedoch jeweils allein nicht für deren Bildung ausreichen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zirkulärer 'ruffles' zeigen segelartige Strukturen sowie die Anreicherung von 'microspikes' und Filopodien in dorsalen Aktinstrukturen. Die Interferenz mit Fascin-Expression und somit mit Filopodienbildung führt zu einer reduzierten Bildung dorsaler, nicht aber peripherer 'ruffles', was auf eine potentielle Funktion dieser Strukturen im dorsalen 'ruffling' schließen lässt. Außerdem beeinträchtigt die Depolymerisation von Mikrotubuli die Ausbildung zirkulärer 'ruffles', wohingegen die Frequenz der Bildung peripherer Protrusionen erhöht ist. Diese Resultate liefern neue Einsichten in die Rolle von Filopodien und deren möglicherweise mechanistische Rolle bei der Bildung zirkulärer 'ruffles'.

Nicht zuletzt zeigt diese Arbeit, dass PDGF-BB-induziertes zirkuläres 'ruffling' ein physiologisches Korrelat in dreidimensionaler Collagen-Matrix hat, was mit einer möglichen Rolle dieser Strukturen bei der Invasivität von Zellen in Einklang steht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung des PDGF β -Rezeptors zur Stimulation von wahrscheinlich zwei unterschiedlichen Signalwegen kommt, die zu 'ruffling' in der Zellperipherie bzw. auf der dorsalen Plasmamembran führen (s. Abbildung 5.1).

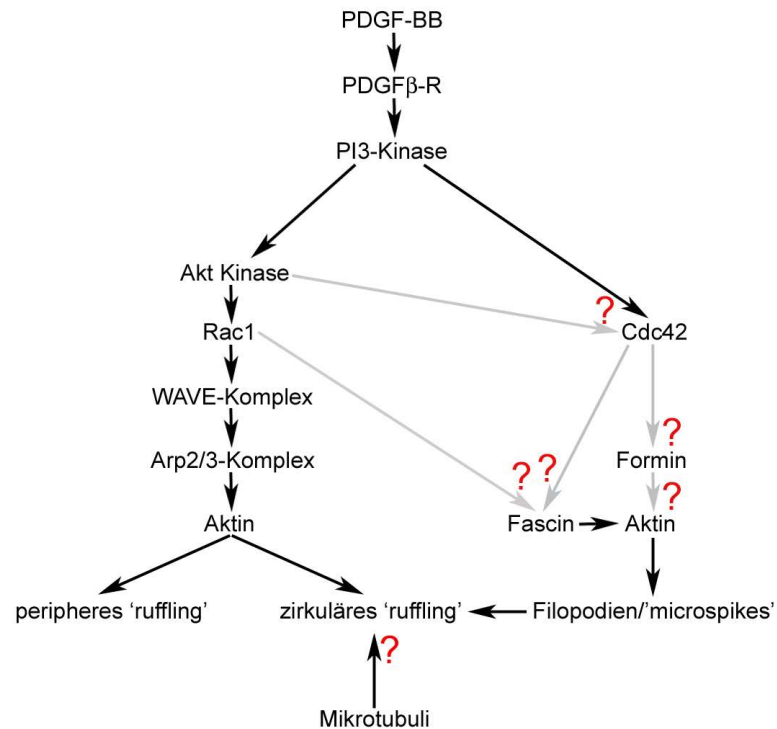


Abbildung 5.1: Modell des PDGF-BB induzierten Signalweges.

Dargestellt ist die durch PDGF-BB potentiell induzierte Signalkaskade, die eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Form von peripheren und zirkulären 'ruffles' zur Folge hat.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abi	Abelson interactor
Abp1	Aktin-bindendes Protein1
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor aus <i>Listeria monocytogenes</i>
ADF	Aktin-depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	ADP ribosylation factor
Arp	Actin related Protein
Arpc	Actin related Protein complex
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	breakpoint cluster region
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	zweiwertige Calciumkationen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cc	kritische Konzentration
CCD	charge-coupled-device
Cdc42	Cell division cycle42
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRIB	Cdc42 and Rac interactive binding
C-terminal	am Carboxyterminus gelegen
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
DTE	Dithioerythrol
ECI	Enhanced Chemoluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol bis (2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELMO	engulfment and motility
Eps8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8
ES	embryonale Stammzellen
et al.	und andere (et alii)
EtOH	Ethanol
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDP	Guanosindiphosphat
GDI	Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitor
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (engl. Guanine nucleotide exchange factor)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HGF	hepatocyte growth factor
IgG	Immunglobulin Klasse G
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K.O.	knock out
L	Liter
LB	Luria Bertani broth
LPA	lysophosphatidic acid
m	Meter
M	Molar (mol/L)
μ	mikro
mA	Milliampere

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MEF	mouse embryonic fibroblast
Mg ²⁺	zweiwertige Magnesiumkationen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIHCK	Myosin I heavy chain kinase
MLCK	Myosin light chain kinase
mm	Millimeter
min	Minute
ms	Millisekunde
mTOR	mammalian target of rapamycin
mV	Millivolt
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
n	nano
Nap	Nck associated protein
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPF	nucleation-promoting factor
N-terminal	am Aminoterminus gelegen
N-WASP	neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein
OD	Optische Dichte
ori	Transkriptionsstartpunkt (engl. origin of replication)
p.a.	pro analysii
PAK	p21-activated protein
PBD	p21-binding domain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen Konzentration
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie Domäne
P _i	anorganisches Phosphat
p85	regulatorische Untereinheit der PI3K

p110	katalytische Untereinheit der PI3K
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
PKB	Protein Kinase B (auch Akt)
PKC	Protein Kinase C
PP	Probenpuffer
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac	Ras associated C3 botulinum toxin substrate
Rho	Ras homology protein
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
s	Sekunde
s.	siehe
SCAR	suppressor of cyclic AMP repressor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2-Domäne	Src-Homologie Domäne2
SH3-Domäne	Src-Homologie Domäne3
Sos1	son of sevenless 1
Sra	specific Rac associated protein
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris Buffered Saline +Tween20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Toca	transducer of Cdc42-dependent actin assembly
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit (Unit)
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP family verprolin-homologous
WH-Domäne	WASP-Homologie Domäne
WIP	WASP-interacting Protein

wt	Wildtyp
w/v	Gewicht per Volumen (engl. weight per Volume)
ü.N.	über Nacht
x g	x-fache Gravitationskraft
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., and E.J. Ambrose. 1958. Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Exp Cell Res.* 15:332-45.
- Adams, J.C. 2004. Fascin protrusions in cell interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 14:221-6.
- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell.* 131:337-50.
- Anitei, M., C. Stange, I. Parshina, T. Baust, A. Schenck, G. Raposo, T. Kirchhausen, and B. Hoflack. Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nat Cell Biol.* 12:330-40.
- Antonetti, D.A., P. Algenstaedt, and C.R. Kahn. 1996. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol.* 16:2195-203.
- Araki, N., T. Hatae, T. Yamada, and S. Hirohashi. 2000. Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging. *J Cell Sci.* 113 (Pt 18):3329-40.
- Arcaro, A., and M.P. Wymann. 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J.* 296 (Pt 2):297-301.
- Arden, H., E. Sandilands, L.M. Machesky, P. Timpson, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2006. Src-dependent phosphorylation of Scar1 promotes its association with the Arp2/3 complex. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:6-13.
- Arvidsson, A.K., C.H. Heldin, and L. Claesson-Welsh. 1992. Transduction of circular membrane ruffling by the platelet-derived growth factor beta-receptor is dependent on its kinase insert. *Cell Growth Differ.* 3:881-7.
- Aspenstrom, P. 1999. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 246:20-5.
- Bakshi, N.A., W.G. Finn, B. Schnitzer, R. Valdez, and C.W. Ross. 2007. Fascin expression in diffuse large B-cell lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, and classical Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 131:742-7.
- Benesch, S., S. Polo, F.P. Lai, K.I. Anderson, T.E. Stradal, J. Wehland, and K. Rottner. 2005. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci.* 118:3103-15.
- Berg, J.S., and R.E. Cheney. 2002. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat Cell Biol.* 4:246-50.
- Biesova, Z., C. Piccoli, and W.T. Wong. 1997. Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth. *Oncogene.* 14:233-41.
- Blagg, S.L., M. Stewart, C. Sambles, and R.H. Insall. 2003. PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Curr Biol.* 13:1480-7.
- Blain, E.J. 2009. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *Int J Exp Pathol.* 90:1-15.
- Block, J., T.E. Stradal, J. Hanisch, R. Geffers, S.A. Kostler, E. Urban, J.V. Small, K. Rottner, and J. Faix. 2008. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J Microsc.* 231:506-17.
- Bonser, R.W., N.T. Thompson, R.W. Randall, J.E. Tateson, G.D. Spacey, H.F. Hodson, and L.G. Garland. 1991. Demethoxyviridin and wortmannin block phospholipase C and D activation in the human neutrophil. *Br J Pharmacol.* 103:1237-41.
- Bosse, T., J. Ehinger, A. Czuchra, S. Benesch, A. Steffen, X. Wu, K. Schloen, H.H. Niemann, G. Scita, T.E. Stradal, C. Brakebusch, and K. Rottner. 2007. Cdc42 and

- phosphoinositide 3-kinase drive Rac-mediated actin polymerization downstream of c-Met in distinct and common pathways. *Mol Cell Biol.* 27:6615-28.
- Bouquier, N., E. Vignal, S. Charrasse, M. Weill, S. Schmidt, J.P. Leonetti, A. Blangy, and P. Fort. 2009. A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol.* 16:657-66.
- Brachmann, S.M., C.M. Yballe, M. Innocenti, J.A. Deane, D.A. Fruman, S.M. Thomas, and L.C. Cantley. 2005. Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Mol Cell Biol.* 25:2593-606.
- Brandt, D.T., and R. Grosse. 2007. Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs. *EMBO Rep.* 8:1019-23.
- Brandt, D.T., S. Marion, G. Griffiths, T. Watanabe, K. Kaibuchi, and R. Grosse. 2007. Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol.* 178:193-200.
- Breitsprecher, D., A.K. Kiesewetter, J. Linkner, C. Urbanke, G.P. Resch, J.V. Small, and J. Faix. 2008. Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *Embo J.* 27:2943-54.
- Bretscher, M.S., and C. Aguado-Velasco. 1998. EGF induces recycling membrane to form ruffles. *Curr Biol.* 8:721-4.
- Brian, P.W. 1957. The effects of some microbial metabolic products on plant growth. *Symp Soc Exp Biol.* 54:166-82.
- Brown, F.D., A.L. Rozelle, H.L. Yin, T. Balla, and J.G. Donaldson. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol.* 154:1007-17.
- Brunk, U., J. Schellens, and B. Westermarck. 1976. Influence of epidermal growth factor (EGF) on ruffling activity, pinocytosis and proliferation of cultivated human glia cells. *Exp Cell Res.* 103:295-302.
- Brunn, G.J., J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J.C. Lawrence, Jr., and R.T. Abraham. 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *Embo J.* 15:5256-67.
- Buccione, R., J.D. Orth, and M.A. McNiven. 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:647-57.
- Burtnick, L.D., E.K. Koepf, J. Grimes, E.Y. Jones, D.I. Stuart, P.J. McLaughlin, and R.C. Robinson. 1997. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell.* 90:661-70.
- Burtnick, L.D., D. Urosov, E. Irobi, K. Narayan, and R.C. Robinson. 2004. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *Embo J.* 23:2713-22.
- Campellone, K.G., N.J. Webb, E.A. Znameroski, and M.D. Welch. 2008. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell.* 134:148-61.
- Cantley, L.C., K.R. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, and S. Soltoff. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 64:281-302.
- Cantley, L.G., and L.C. Cantley. 1995. Signal transduction by the hepatocyte growth factor receptor, c-met. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Am Soc Nephrol.* 5:1872-81.
- Cao, H., J. Chen, M. Awoniyi, J.R. Henley, and M.A. McNiven. 2007. Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *J Cell Sci.* 120:4167-77.
- Castellano, F., C. Le Clainche, D. Patin, M.F. Carlier, and P. Chavrier. 2001. A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J.* 20:5603-14.
- Chang, Y.C., P. Nalbant, J. Birkenfeld, Z.F. Chang, and G.M. Bokoch. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell.* 19:2147-53.
- Chen, F., L. Ma, M.C. Parrini, X. Mao, M. Lopez, C. Wu, P.W. Marks, L. Davidson, D.J. Kwiatkowski, T. Kirchhausen, S.H. Orkin, F.S. Rosen, B.J. Mayer, M.W. Kirschner,

- and F.W. Alt. 2000. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol.* 10:758-65.
- Chereau, D., M. Boczkowska, A. Skwarek-Maruszczyńska, I. Fujiwara, D.B. Hayes, G. Rebowski, P. Lappalainen, T.D. Pollard, and R. Dominguez. 2008. Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science.* 320:239-43.
- Chinkers, M., J.A. McKanna, and S. Cohen. 1979. Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. *J Cell Biol.* 83:260-5.
- Claesson-Welsh, L. 1994. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem.* 269:32023-6.
- Colicelli, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* 2004:RE13.
- Cooper, J.A., and D.A. Schafer. 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol.* 12:97-103.
- Cox, A.D., and C.J. Der. 2002. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther.* 1:599-606.
- Czuchra, A., X. Wu, H. Meyer, J. van Hengel, T. Schroeder, R. Geffers, K. Rottner, and C. Brakebusch. 2005. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell.* 16:4473-84.
- da Costa, S.R., C.T. Okamoto, and S.F. Hamm-Alvarez. 2003. Actin microfilaments et al.--the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:1359-83.
- Dai, Z., and A.M. Pendergast. 1995. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9:2569-82.
- Danson, C.M., S.M. Pocha, G.B. Bloomberg, and G.O. Cory. 2007. Phosphorylation of WAVE2 by MAP kinases regulates persistent cell migration and polarity. *J Cell Sci.* 120:4144-54.
- de la Fuente, M.A., Y. Sasahara, M. Calamito, I.M. Anton, A. Elkhail, M.D. Gallego, K. Suresh, K. Siminovich, H.D. Ochs, K.C. Anderson, F.S. Rosen, R.S. Geha, and N. Ramesh. 2007. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:926-31.
- DeFeo, D., M.A. Gonda, H.A. Young, E.H. Chang, D.R. Lowy, E.M. Scolnick, and R.W. Ellis. 1981. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:3328-32.
- Derry, J.M., H.D. Ochs, and U. Francke. 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell.* 78:635-44.
- Ding, Z., J. Liang, J. Li, Y. Lu, V. Ariyaratna, Z. Lu, M.A. Davies, J.K. Westwick, and G.B. Mills. Physical association of PDK1 with AKT1 is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase. *PLoS One.* 5:e9910.
- Disanza, A., M.F. Carlier, T.E. Stradal, D. Didry, E. Frittoli, S. Confalonieri, A. Croce, J. Wehland, P.P. Di Fiore, and G. Scita. 2004. Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nat Cell Biol.* 6:1180-8.
- Disanza, A., A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner, and G. Scita. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 62:955-70.
- Domin, J., and M.D. Waterfield. 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410:91-5.
- Dominguez, R. 2009. Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44:351-66.
- Dowrick, P., P. Kenworthy, B. McCann, and R. Warn. 1993. Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur J Cell Biol.* 61:44-53.
- Dutcher, S.K. 2003. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol.* 6:634-40.

- Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 418:790-3.
- Eiseler, T., H. Doppler, I.K. Yan, K. Kitatani, K. Mizuno, and P. Storz. 2009. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol*. 11:545-56.
- Ek, B., B. Westermark, A. Wasteson, and C.H. Heldin. 1982. Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature*. 295:419-20.
- Ellis, R.W., D. Defeo, T.Y. Shih, M.A. Gonda, H.A. Young, N. Tsuchida, D.R. Lowy, and E.M. Scolnick. 1981. The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature*. 292:506-11.
- Escobedo, J.A., S. Navankasattusas, W.M. Kavanaugh, D. Milfay, V.A. Fried, and L.T. Williams. 1991. cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. *Cell*. 65:75-82.
- Etienne-Manneville, S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*. 5:470-7.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-35.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*. 421:753-6.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1984. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature*. 310:58-61.
- Faix, J., D. Breitsprecher, T.E. Stradal, and K. Rottner. 2009. Filopodia: Complex models for simple rods. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:1656-64.
- Faix, J., and K. Rottner. 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*. 18:18-25.
- Fan, P.D., and S.P. Goff. 2000. Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor- and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases. *Mol Cell Biol*. 20:7591-601.
- Ferby, I.M., I. Waga, M. Hoshino, K. Kume, and T. Shimizu. 1996. Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 271:11684-8.
- Franke, T.F., S.I. Yang, T.O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D.K. Morrison, D.R. Kaplan, and P.N. Tsichlis. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 81:727-36.
- Frieden, C., and D.W. Goddette. 1983. Polymerization of actin and actin-like systems: evaluation of the time course of polymerization in relation to the mechanism. *Biochemistry*. 22:5836-43.
- Fruman, D.A., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1996. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics*. 37:113-21.
- Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 67:481-507.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873-85.
- Gallo, G., and P.C. Letourneau. 2004. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol*. 58:92-102.
- Gao, X., D. Xing, L. Liu, and Y. Tang. 2009. H-Ras and PI3K are required for the formation of circular dorsal ruffles induced by low-power laser irradiation. *J Cell Physiol*. 219:535-43.
- Gautreau, A., H.Y. Ho, J. Li, H. Steen, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4379-83.
- Genot, E.M., C. Arrieumerlou, G. Ku, B.M. Burgering, A. Weiss, and I.M. Kramer. 2000. The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*. 20:5469-78.

- Glaven, J.A., I. Whitehead, S. Bagrodia, R. Kay, and R.A. Cerione. 1999. The Dbl-related protein, Lfc, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells. *J Biol Chem.* 274:2279-85.
- Goldman, R.D. 1971. The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J Cell Biol.* 51:752-62.
- Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:713-26.
- Gonzalez, E., and T.E. McGraw. 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 8:2502-8.
- Grove, M., G. Demyanenko, A. Echarri, P.A. Zipfel, M.E. Quiroz, R.M. Rodriguiz, M. Playford, S.A. Martensen, M.R. Robinson, W.C. Wetsel, P.F. Maness, and A.M. Pendergast. 2004. ABI2-deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol.* 24:10905-22.
- Guo, F., M. Debidia, L. Yang, D.A. Williams, and Y. Zheng. 2006. Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem.* 281:18652-9.
- Hahne, P., A. Sechi, S. Benesch, and J.V. Small. 2001. Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 492:215-20.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-14.
- Hammacher, A., K. Mellstrom, C.H. Heldin, and B. Westermark. 1989. Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *Embo J.* 8:2489-95.
- Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, and K. Weber. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* 114:4557-65.
- Harper, L., Y. Kashiwagi, C.D. Pusey, B.M. Hendry, and J. Domin. 2007. Platelet-derived growth factor reorganizes the actin cytoskeleton through 3-phosphoinositide-dependent and 3-phosphoinositide-independent mechanisms in human mesangial cells. *Nephron Physiol.* 107:p45-56.
- Hawkins, P.T., A. Eguinoa, R.G. Qiu, D. Stokoe, F.T. Cooke, R. Walters, S. Wennstrom, L. Claesson-Welsh, T. Evans, M. Symons, and et al. 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol.* 5:393-403.
- Hawkins, P.T., T.R. Jackson, and L.R. Stephens. 1992. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature.* 358:157-9.
- Hedberg, K.M., T. Bengtsson, B. Safiejko-Mroczka, P.B. Bell, and M. Lindroth. 1993. PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 24:139-49.
- Heldin, C.H., A. Ernlund, C. Rorsman, and L. Ronnstrand. 1989. Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem.* 264:8905-12.
- Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand. 1998. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1378:F79-113.
- Heldin, C.H., and B. Westermark. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 79:1283-316.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem.* 70:649-76.
- Higuchi, M., N. Masuyama, Y. Fukui, A. Suzuki, and Y. Gotoh. 2001. Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells. *Curr Biol.* 11:1958-62.
- Hiles, I.D., M. Otsu, S. Volinia, M.J. Fry, I. Gout, R. Dhand, G. Panayotou, F. Ruiz-Larrea, A. Thompson, N.F. Totty, and et al. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell.* 70:419-29.

- Hirao, N., S. Sato, T. Gotoh, M. Maruoka, J. Suzuki, S. Matsuda, T. Shishido, and K. Tani. 2006. NESH (Abi-3) is present in the Abi/WAVE complex but does not promote c-Abl-mediated phosphorylation. *FEBS Lett.* 580:6464-70.
- Hu, P., A. Mondino, E.Y. Skolnik, and J. Schlessinger. 1993. Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol Cell Biol.* 13:7677-88.
- Hu, Y.L., S. Li, H. Miao, T.C. Tsou, M.A. del Pozo, and S. Chien. 2002. Roles of microtubule dynamics and small GTPase Rac in endothelial cell migration and lamellipodium formation under flow. *J Vasc Res.* 39:465-76.
- Hunter, T. 1998a. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 353:583-605.
- Hunter, T. 1998b. The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect.* 94:81-119.
- Ikegami, K., and M. Setou. Unique Post-translational Modifications in Specialized Microtubule Architecture. *Cell Struct Funct.*
- Ingram, V.M. 1969. A side view of moving fibroblasts. *Nature.* 222:641-4.
- Innocenti, M., E. Frittoli, I. Ponzanelli, J.R. Falck, S.M. Brachmann, P.P. Di Fiore, and G. Scita. 2003. Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol.* 160:17-23.
- Innocenti, M., S. Gerboth, K. Rottner, F.P. Lai, M. Hertzog, T.E. Stradal, E. Frittoli, D. Didry, S. Polo, A. Disanza, S. Benesch, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita. 2005. Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol.* 7:969-76.
- Inukai, K., M. Anai, E. Van Breda, T. Hosaka, H. Katagiri, M. Funaki, Y. Fukushima, T. Ogihara, Y. Yazaki, Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano. 1996. A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. *J Biol Chem.* 271:5317-20.
- Inukai, K., M. Funaki, T. Ogihara, H. Katagiri, A. Kanda, M. Anai, Y. Fukushima, T. Hosaka, M. Suzuki, B.C. Shin, K. Takata, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano. 1997. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem.* 272:7873-82.
- Irie, H.Y., R.V. Pearline, D. Grueneberg, M. Hsia, P. Ravichandran, N. Kothari, S. Natesan, and J.S. Brugge. 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 171:1023-34.
- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol.* 38:538-55.
- Jackson, T.R., F.D. Brown, Z. Nie, K. Miura, L. Foroni, J. Sun, V.W. Hsu, J.G. Donaldson, and P.A. Randazzo. 2000. ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J Cell Biol.* 151:627-38.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69.
- Jiang, W.G., S. Hiscox, S.K. Singhrao, T. Nakamura, M.C. Puntis, and M.B. Hallett. 1995. Inhibition of HGF/SF-induced membrane ruffling and cell motility by transient elevation of cytosolic free Ca²⁺. *Exp Cell Res.* 220:424-33.
- Johannes, L., and C. Lamaze. 2002. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* 3:443-51.
- Kapeller, R., and L.C. Cantley. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays.* 16:565-76.
- Kapeller, R., K.V. Prasad, O. Janssen, W. Hou, B.S. Schaffhausen, C.E. Rudd, and L.C. Cantley. 1994. Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 269:1927-33.
- Kaplan, D.R., F.C. Chao, C.D. Stiles, H.N. Antoniades, and C.D. Scher. 1979. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood.* 53:1043-52.
- Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms, and M.D. Waterfield. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:615-75.

- Keller, H.U., A. Naef, and A. Zimmermann. 1984. Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res.* 153:173-85.
- Kitano, Y., N. Okada, and J. Adachi. 1986. TPA-induced alteration of actin organization in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res.* 167:369-75.
- Klippel, A., J.A. Escobedo, W.J. Fantl, and L.T. Williams. 1992. The C-terminal SH2 domain of p85 accounts for the high affinity and specificity of the binding of phosphatidylinositol 3-kinase to phosphorylated platelet-derived growth factor beta receptor. *Mol Cell Biol.* 12:1451-9.
- Klippel, A., J.A. Escobedo, Q. Hu, and L.T. Williams. 1993. A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. *Mol Cell Biol.* 13:5560-6.
- Koestler, S.A., S. Auinger, M. Vinzenz, K. Rottner, and J.V. Small. 2008. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol.* 10:306-13.
- Kohler, N., and A. Lipton. 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res.* 87:297-301.
- Koivusalo, M., C. Welch, H. Hayashi, C.C. Scott, M. Kim, T. Alexander, N. Touret, K.M. Hahn, and S. Grinstein. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol.* 188:547-63.
- Korn, E.D., M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 1987. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science.* 238:638-44.
- Kostopoulou, E., A. Daponte, A. Terzis, M. Nakou, I. Chiotoglou, D. Theodosiou, C. Chatzichristodoulou, I.E. Messinis, and G. Koukoulis. 2008. Fascin in ovarian epithelial tumors. *Histol Histopathol.* 23:935-44.
- Kovar, D.R. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 18:11-7.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 15:1942-52.
- Krendel, M., F.T. Zenke, and G.M. Bokoch. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 4:294-301.
- Kunda, P., G. Craig, V. Dominguez, and B. Baum. 2003. Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol.* 13:1867-75.
- Kureishy, N., V. Sapountzi, S. Prag, N. Anilkumar, and J.C. Adams. 2002. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays.* 24:350-61.
- Ladwein, M., and K. Rottner. 2008. On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Lett.* 582:2066-74.
- Lai, F.P., M. Szczodrak, J. Block, J. Faix, D. Breitsprecher, H.G. Mannherz, T.E. Stradal, G.A. Dunn, J.V. Small, and K. Rottner. 2008. Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J.* 27:982-92.
- Lambert, J.M., Q.T. Lambert, G.W. Reuther, A. Malliri, D.P. Siderovski, J. Sondek, J.G. Collard, and C.J. Der. 2002. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol.* 4:621-5.
- Lanzetti, L., A. Palamidessi, L. Areces, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2004. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature.* 429:309-14.
- Lawlor, M.A., and D.R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* 114:2903-10.
- LeClaire, L.L., 3rd, M. Baumgartner, J.H. Iwasa, R.D. Mullins, and D.L. Barber. 2008. Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J Cell Biol.* 182:647-54.

- Legg, J.A., G. Bompard, J. Dawson, H.L. Morris, N. Andrew, L. Cooper, S.A. Johnston, G. Tramontanis, and L.M. Machesky. 2007. N-WASP involvement in dorsal ruffle formation in mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 18:678-87.
- Leng, Y., J. Zhang, K. Badour, E. Arpaia, S. Freeman, P. Cheung, M. Siu, and K. Siminovitch. 2005. Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:1098-103.
- Li, R. 1997. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 136:649-58.
- Lim, Y., S.T. Lim, A. Tomar, M. Gardel, J.A. Bernard-Trifilo, X.L. Chen, S.A. Uryu, R. Canete-Soler, J. Zhai, H. Lin, W.W. Schlaepfer, P. Nalbant, G. Bokoch, D. Ilic, C. Waterman-Storer, and D.D. Schlaepfer. 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol*. 180:187-203.
- Linardopoulou, E.V., S.S. Parghi, C. Friedman, G.E. Osborn, S.M. Parkhurst, and B.J. Trask. 2007. Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet*. 3:e237.
- Lindmo, K., and H. Stenmark. 2006. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*. 119:605-14.
- Liu, B.P., M. Chrzanowska-Wodnicka, and K. Burridge. 1998. Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun*. 5:249-55.
- Liu, S., M. Kapoor, and A. Leask. 2009. Rac1 expression by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *Am J Pathol*. 174:1847-56.
- Lommel, S., S. Benesch, M. Rohde, J. Wehland, and K. Rottner. 2004. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol*. 6:243-54.
- Lommel, S., S. Benesch, K. Rottner, T. Franz, J. Wehland, and R. Kuhn. 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*. 2:850-7.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 8:1347-56.
- Machesky, L.M., R.D. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3739-44.
- Machesky, L.M., E. Reeves, F. Wientjes, F.J. Mattheyse, A. Grogan, N.F. Totty, A.L. Burlingame, J.J. Hsuan, and A.W. Segal. 1997. Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J*. 328 (Pt 1):105-12.
- Madaule, P., and R. Axel. 1985. A novel ras-related gene family. *Cell*. 41:31-40.
- Mahaffy, R.E., and T.D. Pollard. 2008. Influence of phalloidin on the formation of actin filament branches by Arp2/3 complex. *Biochemistry*. 47:6460-7.
- Mallavarapu, A., and T. Mitchison. 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol*. 146:1097-106.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:446-54.
- May, R.C. 2001. The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci*. 58:1607-26.
- McGough, A.M., C.J. Staiger, J.K. Min, and K.D. Simonetti. 2003. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett*. 552:75-81.
- Mellstrom, K., C.H. Heldin, and B. Westermark. 1988. Induction of circular membrane ruffling on human fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res*. 177:347-59.
- Mellstrom, K., A.S. Hoglund, M. Nister, C.H. Heldin, B. Westermark, and U. Lindberg. 1983. The effect of platelet-derived growth factor on morphology and motility of human glial cells. *J Muscle Res Cell Motil*. 4:589-609.

- Mikhailov, A., and G.G. Gundersen. 1998. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil Cytoskeleton*. 41:325-40.
- Miki, H., K. Miura, and T. Takenawa. 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J*. 15:5326-35.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*. 17:6932-41.
- Min, S.H., and C.S. Abrams. 2009. Why do phosphatidylinositol kinases have so many isoforms? *Biochem J*. 423:e5-8.
- Mitchison, T., L. Evans, E. Schulze, and M. Kirschner. 1986. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell*. 45:515-27.
- Mullins, R.D., W.F. Stafford, and T.D. Pollard. 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*. 136:331-43.
- Nichols, B.J., and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 11:406-12.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81:53-62.
- Oakley, B.R. 1992. Gamma-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol*. 2:1-5.
- Oakley, C.E., and B.R. Oakley. 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 338:662-4.
- Oliver, J.M., R.D. Berlin, and B.H. Davis. 1984. Use of horseradish peroxidase and fluorescent dextrans to study fluid pinocytosis in leukocytes. *Methods Enzymol*. 108:336-47.
- Orth, J.D., and M.A. McNiven. 2006. Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. *Cancer Res*. 66:11094-6.
- Otsu, M., I. Hiles, I. Gout, M.J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty, and et al. 1991. Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell*. 65:91-104.
- Paavilainen, V.O., E. Bertling, S. Falck, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*. 14:386-94.
- Padrick, S.B., H.C. Cheng, A.M. Ismail, S.C. Panchal, L.K. Doolittle, S. Kim, B.M. Skehan, J. Umetani, C.A. Brautigam, J.M. Leong, and M.K. Rosen. 2008. Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Mol Cell*. 32:426-38.
- Palamidessi, A., E. Frittoli, M. Garre, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2008. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 134:135-47.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M.F. Carlier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science*. 292:1502-6.
- Park, H., K. Staehling-Hampton, M.W. Appleby, M.E. Brunkow, T. Habib, Y. Zhang, F. Ramsdell, H.D. Liggitt, B. Freie, M. Tsang, G. Carlson, S. Friend, C. Frevert, and B.M. Iritani. 2008. A point mutation in the murine Hem1 gene reveals an essential role for Hematopoietic protein 1 in lymphopoiesis and innate immunity. *J Exp Med*. 205:2899-913.
- Paterson, H.F., A.J. Self, M.D. Garrett, I. Just, K. Aktories, and A. Hall. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*. 111:1001-7.
- Pellegrin, S., and H. Mellor. 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol*. 15:129-33.
- Peng, J., B.J. Wallar, A. Flanders, P.J. Swiatek, and A.S. Alberts. 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol*. 13:534-45.

- Pollard, T.D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 103:2747-54.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:545-76.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-65.
- Pollitt, A.Y., and R.H. Insall. 2008. Abi mutants in Dictyostelium reveal specific roles for the SCAR/WAVE complex in cytokinesis. *Curr Biol.* 18:203-10.
- Prehoda, K.E., J.A. Scott, R.D. Mullins, and W.A. Lim. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science.* 290:801-6.
- Qualmann, B., and M.M. Kessels. 2009. New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol.* 19:276-85.
- Quinlan, M.E., and E. Kerkhoff. 2008. Actin nucleation: bacteria get in-Spired. *Nat Cell Biol.* 10:13-5.
- Rakeman, A.S., and K.V. Anderson. 2006. Axis specification and morphogenesis in the mouse embryo require Nap1, a regulator of WAVE-mediated actin branching. *Development.* 133:3075-83.
- Randazzo, P.A., J. Andrade, K. Miura, M.T. Brown, Y.Q. Long, S. Stauffer, P. Roller, and J.A. Cooper. 2000. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4011-6.
- Ren, Y., R. Li, Y. Zheng, and H. Busch. 1998. Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *J Biol Chem.* 273:34954-60.
- Repasky, G.A., E.J. Chenette, and C.J. Der. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* 14:639-47.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-10.
- Rogers, S.L., U. Wiedemann, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2003. Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells. *J Cell Biol.* 162:1079-88.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 150:1299-310.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 97:221-31.
- Ross, J.L., M.Y. Ali, and D.M. Warshaw. 2008. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 20:41-7.
- Ross, R., J. Glomset, B. Kariya, and L. Harker. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1207-10.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:167-80.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.
- Ruusala, A., C. Sundberg, A.K. Arvidsson, E. Rupp-Thureson, C.H. Heldin, and L. Claesson-Welsh. 1998. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced actin rearrangement is deregulated in cells expressing a mutant Y778F PDGF beta-receptor. *J Cell Sci.* 111 (Pt 1):111-20.
- Saarikangas, J., H. Zhao, and P. Lappalainen. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev.* 90:259-89.
- Sasahara, Y., R. Rachid, M.J. Byrne, M.A. de la Fuente, R.T. Abraham, N. Ramesh, and R.S. Geha. 2002. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell.* 10:1269-81.

- Schenck, A., B. Bardoni, A. Moro, C. Bagni, and J.L. Mandel. 2001. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8844-9.
- Schirenbeck, A., R. Arasada, T. Bretschneider, T.E. Stradal, M. Schleicher, and J. Faix. 2006. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7694-9.
- Schirenbeck, A., T. Bretschneider, R. Arasada, M. Schleicher, and J. Faix. 2005. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol.* 7:619-25.
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103:211-25.
- Schliwa, M., T. Nakamura, K.R. Porter, and U. Euteneuer. 1984. A tumor promoter induces rapid and coordinated reorganization of actin and vinculin in cultured cells. *J Cell Biol.* 99:1045-59.
- Schober, J.M., Y.A. Komarova, O.Y. Chaga, A. Akhmanova, and G.G. Borisy. 2007. Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J Cell Sci.* 120:1235-44.
- Schuler, H. 2001. ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin. *Biochim Biophys Acta.* 1549:137-47.
- Scita, G., J. Nordstrom, R. Carbone, P. Tenca, G. Giardina, S. Gutkind, M. Bjarnegard, C. Betsholtz, and P.P. Di Fiore. 1999. EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature.* 401:290-3.
- Scita, G., P. Tenca, L.B. Areces, A. Tocchetti, E. Frittoli, G. Giardina, I. Ponzanelli, P. Sini, M. Innocenti, and P.P. Di Fiore. 2001. An effector region in Eps8 is responsible for the activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *J Cell Biol.* 154:1031-44.
- Shim, J., S.M. Lee, M.S. Lee, J. Yoon, H.S. Kweon, and Y.J. Kim. Rab35 mediates transport of Cdc42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis. *Mol Cell Biol.* 30:1421-33.
- Skolnik, E.Y., B. Margolis, M. Mohammadi, E. Lowenstein, R. Fischer, A. Drepps, A. Ullrich, and J. Schlessinger. 1991. Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell.* 65:83-90.
- Small, J.V., G. Isenberg, and J.E. Celis. 1978. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature.* 272:638-9.
- Small, J.V., T. Stradal, E. Vignal, and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12:112-20.
- Snapper, S.B., and F.S. Rosen. 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol.* 17:905-29.
- Snapper, S.B., F. Takeshima, I. Anton, C.H. Liu, S.M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R.C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M.B. Goldberg, F.S. Rosen, J.H. Hartwig, and F.W. Alt. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol.* 3:897-904.
- Sossey-Alaoui, K., K. Head, N. Nowak, and J.K. Cowell. 2003. Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm Genome.* 14:314-22.
- Steffen, A., J. Faix, G.P. Resch, J. Linkner, J. Wehland, J.V. Small, K. Rottner, and T.E. Stradal. 2006. Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell.* 17:2581-91.
- Steffen, A., K. Rottner, J. Ehinger, M. Innocenti, G. Scita, J. Wehland, and T.E. Stradal. 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J.* 23:749-59.
- Stein, R.C., and M.D. Waterfield. 2000. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today.* 6:347-57.

- Stephens, L., A. Eguinoa, S. Corey, T. Jackson, and P.T. Hawkins. 1993. Receptor stimulated accumulation of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells. *Embo J.* 12:2265-73.
- Stovold, C.F., T.H. Millard, and L.M. Machesky. 2005. Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol.* 6:11.
- Stradal, T.E., K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti, and G. Scita. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14:303-11.
- Stradal, T.E., and G. Scita. 2006. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 18:4-10.
- Stuart, J.R., F.H. Gonzalez, H. Kawai, and Z.M. Yuan. 2006. c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J Biol Chem.* 281:31290-7.
- Suetsugu, S., S. Kurisu, T. Oikawa, D. Yamazaki, A. Oda, and T. Takenawa. 2006. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol.* 173:571-85.
- Suetsugu, S., H. Miki, and T. Takenawa. 1999. Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 260:296-302.
- Suetsugu, S., H. Miki, H. Yamaguchi, T. Obinata, and T. Takenawa. 2001. Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J Cell Sci.* 114:4533-42.
- Suetsugu, S., D. Yamazaki, S. Kurisu, and T. Takenawa. 2003. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell.* 5:595-609.
- Sun, H.Q., M. Yamamoto, M. Mejillano, and H.L. Yin. 1999. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem.* 274:33179-82.
- Sun, P., H. Yamamoto, S. Suetsugu, H. Miki, T. Takenawa, and T. Endo. 2003. Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J Biol Chem.* 278:4063-71.
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145:1009-26.
- Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160:409-21.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:639-49.
- Swanson, J.A., and C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-8.
- Symons, M., J.M. Derry, B. Karlak, S. Jiang, V. Lemahieu, F. McCormick, U. Francke, and A. Abo. 1996. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell.* 84:723-34.
- Takenawa, T., and H. Miki. 2001. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.* 114:1801-9.
- Takenawa, T., and S. Suetsugu. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:37-48.
- Tolias, K.F., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem.* 270:17656-9.
- Urban, E., S. Jacob, M. Nemethova, G.P. Resch, and J.V. Small. Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat Cell Biol.* 12:429-35.
- Urosov, D., Q. Ma, A.L. Tan, R.C. Robinson, and L.D. Burtnick. 2006. The structure of gelsolin bound to ATP. *J Mol Biol.* 357:765-72.
- Valgeirsdottir, S., L. Claesson-Welsh, E. Bongcam-Rudloff, U. Hellman, B. Westermark, and C.H. Heldin. 1998. PDGF induces reorganization of vimentin filaments. *J Cell Sci.* 111 (Pt 14):1973-80.

- van Rheenen, J., X. Song, W. van Roosmalen, M. Cammer, X. Chen, V. Desmarais, S.C. Yip, J.M. Backer, R.J. Eddy, and J.S. Condeelis. 2007. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J Cell Biol.* 179:1247-59.
- Van Troys, M., D. Dewitte, J.L. Verschelde, M. Goethals, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 2000. The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant. *Biochemistry.* 39:12181-9.
- Van Troys, M., L. Huyck, S. Leyman, S. Dhaese, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 2008. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol.* 87:649-67.
- van Weering, D.H., J. de Rooij, B. Marte, J. Downward, J.L. Bos, and B.M. Burgering. 1998. Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol.* 18:1802-11.
- Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, and B. Bilanges. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:329-41.
- Vanhaesebroeck, B., S.J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P.C. Driscoll, R. Woscholski, P.J. Parker, and M.D. Waterfield. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 70:535-602.
- Vanhaesebroeck, B., M.J. Welham, K. Kotani, R. Stein, P.H. Warne, M.J. Zvelebil, K. Higashi, S. Volinia, J. Downward, and M.D. Waterfield. 1997. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4330-5.
- Vasiliev, J.M. 1991. Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J Cell Sci.* 98 (Pt 1):1-4.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-40.
- Verhey, K.J., and J. Gaertig. 2007. The tubulin code. *Cell Cycle.* 6:2152-60.
- Vidali, L., F. Chen, G. Cicchetti, Y. Ohta, and D.J. Kwiatkowski. 2006. Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell.* 17:2377-90.
- Vignjevic, D., S. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol.* 174:863-75.
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui, and R.F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 269:5241-8.
- Volkman, B.F., K.E. Prehoda, J.A. Scott, F.C. Peterson, and W.A. Lim. 2002. Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell.* 111:565-76.
- Wade, R.H. 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol.* 43:177-91.
- Wade, R.H., and A.A. Hyman. 1997. Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 9:12-7.
- Walker, E.H., M.E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wymann, and R.L. Williams. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell.* 6:909-19.
- Wang, D., Y.C. Tan, G.E. Kreitzer, Y. Nakai, D. Shan, Y. Zheng, and X.Y. Huang. 2006. G proteins G12 and G13 control the dynamic turnover of growth factor-induced dorsal ruffles. *J Biol Chem.* 281:32660-7.
- Wang, Y.L. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol.* 101:597-602.
- Watts, C., and M. Marsh. 1992. Endocytosis: what goes in and how? *J Cell Sci.* 103 (Pt 1):1-8.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol.* 108:139-50.
- Weiner, O.D., M.C. Rentel, A. Ott, G.E. Brown, M. Jedrychowski, M.B. Yaffe, S.P. Gygi, L.C. Cantley, H.R. Bourne, and M.W. Kirschner. 2006. Hem-1 complexes are essential for Rac activation, actin polymerization, and myosin regulation during neutrophil chemotaxis. *PLoS Biol.* 4:e38.

- Weiss, S.M., M. Ladwein, D. Schmidt, J. Ehinger, S. Lommel, K. Stading, U. Beutling, A. Disanza, R. Frank, L. Jansch, G. Scita, F. Gunzer, K. Rottner, and T.E. Stradal. 2009. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspFU for actin pedestal formation. *Cell Host Microbe*. 5:244-58.
- Welch, H.C., W.J. Coadwell, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 2003. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*. 546:93-7.
- Welch, M.D., A.H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*. 138:375-84.
- Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:247-88.
- Welch, M.D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D.A. Portnoy, and T.J. Mitchison. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*. 281:105-8.
- Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzer, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 6:820-30.
- Wennerberg, K., and C.J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*. 117:1301-12.
- Wennstrom, S., P. Hawkins, F. Cooke, K. Hara, K. Yonezawa, M. Kasuga, T. Jackson, L. Claesson-Welsh, and L. Stephens. 1994a. Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol*. 4:385-93.
- Wennstrom, S., A. Siegbahn, K. Yokote, A.K. Arvidsson, C.H. Heldin, S. Mori, and L. Claesson-Welsh. 1994b. Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene*. 9:651-60.
- Westermarck, B., and A. Wasteson. 1976. A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res*. 98:170-4.
- Winter, D., T. Lechler, and R. Li. 1999. Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol*. 9:501-4.
- Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci*. 114:3795-803.
- Wymann, M., and A. Arcaro. 1994. Platelet-derived growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation mediates actin rearrangements in fibroblasts. *Biochem J*. 298 Pt 3:517-20.
- Wymann, M.P., G. Bulgarelli-Leva, M.J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield, and G. Panayotou. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol*. 16:1722-33.
- Yan, C., N. Martinez-Quiles, S. Eden, T. Shibata, F. Takeshima, R. Shinkura, Y. Fujiwara, R. Bronson, S.B. Snapper, M.W. Kirschner, R. Geha, F.S. Rosen, and F.W. Alt. 2003. WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *Embo J*. 22:3602-12.
- Yang, L., L. Wang, and Y. Zheng. 2006. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 17:4675-85.
- Yarar, D., W. To, A. Abo, and M.D. Welch. 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 9:555-8.
- Yarden, Y., J.A. Escobedo, W.J. Kuang, T.L. Yang-Feng, T.O. Daniel, P.M. Tremble, E.Y. Chen, M.E. Ando, R.N. Harkins, U. Francke, and et al. 1986. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*. 323:226-32.
- Zhang, H., L. Xu, D. Xiao, J. Xie, H. Zeng, W. Cai, Y. Niu, Z. Yang, Z. Shen, and E. Li. 2006. Fascin is a potential biomarker for early-stage oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 59:958-64.

- Zhou, G.L., D.F. Tucker, S.S. Bae, K. Bhatheja, M.J. Birnbaum, and J. Field. 2006. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J Biol Chem.* 281:36443-53.
- Zuchero, J.B., A.S. Coutts, M.E. Quinlan, N.B. Thangue, and R.D. Mullins. 2009. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol.* 11:451-9.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Aktin-Polymerisation (Dominguez, 2009; modifiziert).....	2
Abbildung 1.2: Strukturen des Aktinzytoskeletts.	3
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der WASP/WAVE-Protein Domänen (Stradal, 2004).	11
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus bzw. diverser Regulatoren des WAVE-Komplexes (Gautreau, 2004; modifiziert).	13
Abbildung 1.5: Phylogenetischer Stammbaum der RhoGTPasen und Repräsentanten der übrigen GTPasen der Ras-Superfamilie (Wennerberg und Der, 2004).	16
Abbildung 1.6: Der RhoGTPase-Zyklus (Etienne-Manneville und Hall, 2002).....	17
Abbildung 1.7: Endozytische Signalwege in Säugerzellen (Johannes und Lamaze, 2002).	27
Abbildung 3.1: PDGF-induzierte Aktinreorganisation in Mausfibroblasten.	64
Abbildung 3.2: Inhibierung der PI3-Kinase durch 20 µM LY294002.....	66
Abbildung 3.3: PI3-Kinase-Inhibition durch LY294002 unterbindet die Bildung zirkulärer 'ruffles' in der PDGF-induzierten Signalkaskade.	67
Abbildung 3.4: Reduzierte Rac-Aktivierung nach LY294002.....	68
Abbildung 3.5: Inhibition der PI3-Kinase mittels 100 nM Wortmannin.	69
Abbildung 3.6: PI3-Kinase-Inhibition mittels Wortmannin blockiert PDGF-induzierte Membrankräuselungen.	70
Abbildung 3.7: Blockierte Rac-Aktivierung nach Wortmannin-Behandlung.	72
Abbildung 3.8: Inhibierung der Akt Kinase durch 2.5 µM Akt-Inhibitor.....	73
Abbildung 3.9: Blockierung der Bildung zirkulärer 'Ruffles' nach Akt Kinase Inhibierung.	74
Abbildung 3.10: Rac-Aktivierung ist nach Akt-Inhibition nicht detektierbar.	75
Abbildung 3.11: Lokalisation der Akt Kinase in Cdc42 (fl/-)-Kontrollzellen.	76
Abbildung 3.12: PDGF-Stimulierung aktiviert die kleine RhoGTPase Cdc42.	77
Abbildung 3.13: Starke Reduzierung zirkulärer 'ruffles' in Cdc42 KO-Zellen.....	78

Abbildung 3.14: Verringerte Makropinozytose-Rate in Cdc42 KO-Zellen.	79
Abbildung 3.15: Die Bildung zirkulärer Aktinstrukturen ist N-WASP unabhängig.	81
Abbildung 3.16: Effizienter N-WASP 'knockdown' 72 h nach Transfektion.	82
Abbildung 3.17: N-WASP 'knockdown' hat keinen Einfluss auf PDGF-induzierte Membran 'ruffles'.	83
Abbildung 3.18: N-WASP lokalisiert nicht in PDGF-induzierten Aktinstrukturen.	84
Abbildung 3.19: PDGF-BB stimuliert die Rac-Aktivierung in Cdc42-KO-Zellen.	88
Abbildung 3.20: Effizienter Rac1 'knockdown' 96 h nach Transfektion.	88
Abbildung 3.21: Rac1 'knockdown' führt zu reduziertem Membran 'ruffling'.	89
Abbildung 3.22: Lokalisation prominenter Regulatoren des peripheren 'rufflings' in zirkulären Aktinstrukturen.	91
Abbildung 3.23: WAVE2 lokalisiert an der Spitze von zirkulären 'ruffles'.	92
Abbildung 3.24: Effizienter Nap1 'knockdown' 96 h nach Transfektion.	93
Abbildung 3.25: Nap1 'knockdown' beeinträchtigt PDGF-induziertes 'ruffling'.	93
Abbildung 3.26: Erfolgreiche Deletion von Exon1 des Abi1-Gens.	95
Abbildung 3.27: Die Expression weiterer WAVE-Komplex-Komponenten ist reduziert in Abi1 'knockout'-Zellen.	96
Abbildung 3.28: Abi1 ist in der Immunfluoreszenz nicht detektierbar.	97
Abbildung 3.29: Reduzierte Bildung zirkulärer 'ruffles' in Abi(-/-)-Zellen.	98
Abbildung 3.30: Dorsale 'ruffles' in der Rasterelektronenmikroskopie.	100
Abbildung 3.31: 'Microspikes' in zirkulären 'ruffles'.	101
Abbildung 3.32: Fascin lokalisiert in PDGF-induzierten Aktinstrukturen.	102
Abbildung 3.33: VASP als Markerprotein für Fokalkontakte, Lamellipodien und dorsale 'ruffles'.	103
Abbildung 3.34: Lokalisation von MyosinX an der Spitze von Filopodien und 'microspikes'.	104
Abbildung 3.35: Effizienter Fascin 'knockdown' 96 h nach Transfektion.	105
Abbildung 3.36: Fascin 'knockdown' reduziert PDGF-induzierte zirkuläre Aktinstrukturen.	106

Abbildung 3.37: Die Depolymerisation von Mikrotubuli hat einen Einfluss auf PDGF-induziertes 'ruffling'.	108
Abbildung 3.38: Lokalisierung von α Tubulin in zirkulären Aktinstrukturen.	110
Abbildung 3.39: WAVE2 lokalisiert nach Depolymerisation der Mikrotubuli in peripheren Aktinstrukturen.	111
Abbildung 3.40: Geringfügige Reduktion der Rac-Aktivität in Nocodazol behandelten Zellen.	112
Abbildung 3.41: Zirkuläres 'ruffling' in einer 3D-Matrix.	113
Abbildung 5.1: Modell des PDGF-BB induzierten Signalweges.	130

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Zelllinien.	36
Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Konstrukte.	37
Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Primer.	37
Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten 'knockdown'-Konstrukte und der entsprechenden 'knockdown'-Sequenzen.	50
Tabelle 2.5: Übersicht der für den Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper.	55

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Theresia Stradal bedanken: für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, für die hervorragende Betreuung während der letzten drei Jahre und für die Übernahme des Korreferats. Des weiteren bedanke ich mich bei Dr. Klemens Rottner, der durch seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft ebenfalls maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Wehland für die Übernahme des Referats dieser Arbeit sowie Prof. Dr. Martin Korte für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Danken möchte ich außerdem Dr. Leszek Kotula für die Möglichkeit und die großartige Erfahrung einen Teil meiner Arbeit in seinem Labor in NYC anzufertigen. Sein Team hat mich sehr herzlich aufgenommen, wofür ich besonders Patrycja danken möchte.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Manfred Rohde und Dr. Lothar Gröbe für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bzw. für das 'Sorten' meiner Zellen bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die (auch ehemaligen) Mitglieder der Arbeitsgruppen SIM, CYD und ZB im Allgemeinen und an Margit, Jenny, Gosia und Jan im Speziellen, für die unermüdliche und uneingeschränkte Hilfe, für die mal mehr und mal weniger wissenschaftlichen Schnackrunden und die unzähligen, unvergesslichen Partys,...insane in the membrane ☺. Ihr seid toll und ich werd euch/es vermissen.

Danken möchte ich außerdem Dr. Martin Rothkegel und Tania Meßerschmidt, die mein Interesse an der Zellbiologie überhaupt erst geweckt haben.

Zudem möchte ich mich noch bei einigen, mir sehr wichtigen Menschen bedanken, wie den BS-Mädels Vanessa, Sabine, Margit und Julia für Aktionen wie das Laternen-You-Tube-Party-Fest...den BH-Mädels Jenny, Christin, Brina, Annika, Annika und Claudia für die schönsten nicht-wissenschaftlichen Gespräche und na, da haben wir ja wieder ne Truppe zusammen...und natürlich Tanja, für BoSchlo, oh nee, nicht Palladin, weil sie immer ein offenes Ohr hat und vieles mehr.

Meiner gesamten Familie sage ich danke für Ihre Unterstützung.

Und ein besonderes Dankeschön richtet sich an einen besonderen Menschen – Markus, weil ohne dich...

10 Lebenslauf

Name: Kathrin Imke Schloen

email: Kathrin.Schloen@web.de

Geburtsdatum: 19.02.1979

Geburtsort: Göttingen, Niedersachsen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

Juni 2007 - Juli 2008:	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe für Signaltransduktion und Motilität am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig, Deutschland
Juli 2006 - März 2007:	Diplomarbeit mit dem Titel „Die Rolle von Cdc42 in PDGF-induzierten Aktinreorganisationen“ in der Arbeitsgruppe für Signaltransduktion und Motilität am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig, Deutschland
Oktober 2003 - Mai 2007:	Diplomstudiengang Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Juni 2001 - Juli 2003	Beschäftigung als BTA an der TU Braunschweig, Zoologisches Institut (Zellbiologie), Braunschweig
Juli 2000 - April 2001	Beschäftigung als BTA am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Molekulare Zellbiologie), Göttingen
August 1998 - Juli 2000	Abgeschlossene Ausbildung zur Biologisch-Technischen-Assistentin an der Dr. von Morgenstern Schule, Braunschweig

Schullaufbahn:

1991 - 1998:	Werner-von-Siemens Gymnasium, Bad Harzburg, Schulabschluss: Abitur
1989 - 1991:	Orientierungsstufe Deilich, Bad Harzburg
1985 - 1989:	Grundschule Bündheim, Bad Harzburg